



Marta Ferreira Rolim

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

Contribuição para o estudo da caracterização de biofilmes de diferentes idades

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do
Ambiente, perfil Engenharia Sanitária

Orientador: Rita Maurício Rodrigues Rosa, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de
Lisboa.

Co-orientador: Gilda de Sousa Carvalho Oehmen, Doutora,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de
Lisboa.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Fernando José Pires Santana
Arguente: Prof.^a Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral
Vogal: Prof.^a Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro de 2014



Marta Ferreira Rolim

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

Contribuição para o estudo da caracterização de biofilmes de diferentes idades

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do
Ambiente, perfil Engenharia Sanitária

Orientador: Rita Maurício Rodrigues Rosa, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de
Lisboa.

Co-orientador: Gilda de Sousa Carvalho Oehmen, Doutora,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de
Lisboa.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Fernando José Pires Santana
Arguente: Prof.^a Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral
Vogal: Prof.^a Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro de 2014

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES DE DIFERENTES IDADES

Copyright © Marta Ferreira Rolim, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus agradecimentos às seguintes pessoas:

À Prof. Doutora Rita Maurício pela orientação prestada e por todo o apoio e disponibilidade ao longo deste trabalho. Principalmente na altura do trabalho de laboratório que nem sempre correu como esperado.

À Doutora Gilda Carvalho pela ajuda incondicional no trabalho laboratorial, pela cedência de equipamento e por todos os esclarecimentos cedidos. E pela disponibilidade que sempre demonstrou.

À D. Luísa e D. Adélia por toda a ajuda e apoio prestados no laboratório.

Aos meus pais porque sem eles seria tudo muito mais difícil. E ao meu avô que sempre me deu apoio e força para terminar esta etapa.

Finalmente, um agradecimento especial ao Fábio por toda a ajuda e apoio ao longo destes meses, e principalmente por todas as horas que passou comigo no laboratório. E pelas “engenhocas” que inventou e que me ajudaram e desenrascaram bastante.

RESUMO

Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade complexa, constituída principalmente por água, microrganismos e substâncias poliméricas extracelulares (EPS), estando aderidos a uma superfície sólida. Um biofilme pode ser constituído por uma única espécie ou, na maioria dos casos, por inúmeras espécies, sendo as bactérias, fungos, algas e protozoários os principais microrganismos, embora as bactérias representem o grupo dominante.

Os biofilmes desempenham um papel bastante relevante nos sistemas de biomassa fixa no tratamento de águas residuais, oferecendo diversas vantagens. Assim, o seu estudo e a compreensão das suas características torna-se essencial para a garantia de eficiências elevadas nestes sistemas.

O presente trabalho pretendeu contribuir para o estudo de biofilmes de diferentes idades, nomeadamente na identificação e caracterização dos microrganismos dominantes. A idade do biofilme é um parâmetro fundamental na exploração de sistemas de biomassa fixa, uma vez que já se demonstrou ser vantajoso no controlo da espessura do biofilme.

O crescimento dos biofilmes foi possível devido a um dispositivo experimental concebido para se obter biofilmes de determinada espessura (ou idade). O método adoptado neste estudo para a identificação dos microrganismos foi o FISH (Hibridação *in situ* de fluorescência), uma vez que este permite a identificação, quantificação e localização espacial de microrganismos directamente nos seus habitats naturais.

Através dos resultados obtidos, pôde constatar-se que a idade de biofilme de 0,5 – 1 dia apresentou maiores diferenças no perfil microbiano comparativamente com as restantes idades (4 – 5 dias e 5 – 6 dias), parecendo demonstrar uma menor abundância de tipos de bactérias. Também se concluiu que, para a idade de biofilme menor (0,5 – 1 dia), as bactérias presentes em maior abundância foram as *Gammaproteobacteria*, para a idade de 4 a 5 dias foram as *Betaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* e *Actinobacteria*, e para a idade de 5 a 6 dias foram as *Betaproteobacteria* e *Cytophaga-Flavobacteria*.

Os resultados obtidos possibilitaram um conhecimento mais aprofundado dos microrganismos presentes em biofilmes de idades distintas, podendo contribuir para a optimização de sistemas de biomassa fixa. Assim, se se adoptar este tipo de conhecimento em ETAR por sistemas de biomassa fixa no tratamento de águas residuais, poder-se-á contribuir para a melhoria do funcionamento da instalação, principalmente no que diz respeito à sua eficiência de tratamento.

TERMOS-CHAVE: Biofilme; Microrganismos; Bactérias; Identificação; FISH.

ABSTRACT

Biofilms can be defined as a complex community, consisting mainly of water, microorganisms and extracellular polymeric substances (EPS), which are attached to a solid surface. A biofilm may be composed of a single specie or, in most cases, by several species. Bacteria, fungi, algae and protozoa are the main microorganisms, although bacteria represent the dominant group.

Biofilms play a very relevant role in fixed biomass systems in wastewater treatment, offering several advantages. Thus, their study and the understanding of its characteristics becomes essential to guarantee high efficiencies in these systems.

The present work aimed to contribute to the study of biofilms of different ages, particularly in the identification and characterization of dominant microorganisms. The biofilm age is a key parameter in operation of fixed biomass systems, since it has already been shown to be beneficial in controlling of biofilm thickness.

The growth of biofilms was possible due to an experimental apparatus designed to obtain a specific biofilm thickness (or age). The method adopted in this study for the identification of microorganisms was the FISH method (Fluorescent *in situ* Hybridization), since this allows the identification, quantification and spatial localization of microorganisms directly in their natural habitats.

Through results, it was noted that biofilm age of 0,5 – 1 day showed greater differences in microbial profile compared with other ages (4 – 5 days and 5 – 6 days), seeming to demonstrate a lower abundance of bacteria's types. Also concluded that, for lower biofilm age (0,5 – 1 day), bacteria in greater abundance were *Gammaproteobacteria*, for the age of 4 – 5 days were *Betaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* and *Actinobacteria*, and for the age of 5 – 6 days were *Betaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria*.

The results enabled a deeper knowledge of microorganisms in biofilms of different ages and may contribute to the optimization of fixed biomass systems. Thus, if adopting this kind of knowledge on WWTP by fixed biomass systems in wastewater treatment, it will be possible to contribute to improving the operation of WWTP, mainly with respect to their treatment efficiency.

KEYWORDS: Biofilm; Microorganisms; Bacteria; Identification; FISH.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. Aspectos gerais sobre o tratamento de águas residuais.....	1
1.2. Sistemas de tratamento por biomassa fixa	1
1.2.1. Discos Biológicos	3
1.3. Biofilmes	6
1.3.1. Introdução	6
1.3.2. Conceito	7
1.3.3. Composição	7
1.3.4. Formação	8
1.3.4.1. Principais factores que influenciam a formação de biofilmes	9
1.3.5. Estrutura	10
1.3.6. <i>Quorum sensing</i>	11
1.3.7. Microrganismos mais frequentes em biofilmes (no tratamento de água residual)	12
1.3.7.1. Características dos microrganismos	15
1.3.8. Importância dos biofilmes	17
1.3.8.1. Aspectos benéficos	17
1.3.8.2. Aspectos prejudiciais.....	17
1.4. Métodos existentes para a identificação de microrganismos	18
1.4.1. Métodos <i>ex situ</i>	18
1.4.2. Métodos <i>in situ</i> não moleculares.....	19
1.4.3. Métodos <i>in situ</i> moleculares.....	20
2. Objectivos.....	25
3. Plano Experimental	27
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Materiais	29
4.1.1. Substrato	29
4.1.2. Dispositivos experimentais.....	29
4.1.2.1. Para a obtenção de biofilmes	29
4.2. Métodos	31
4.2.1. Carência Química de Oxigénio (CQO)	31

4.2.2. Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	33
4.2.3. pH	33
4.2.4. Oxigénio Dissolvido.....	33
4.3. Modo Operatório	34
4.3.1. Procedimento de base	34
4.3.2. Operação dos reactores.....	35
4.3.3. Procedimento para a identificação da biomassa presente nos biofilmes	37
4.3.3.1. Fixação das amostras	37
4.3.3.2. Técnica FISH	38
5. Resultados e Discussão	43
5.1. Resultados da Fase 0	43
5.2. Resultados da Fase 1	44
6. Conclusões.....	57
6.1. Perspectivas de trabalho futuro	57
7. Bibliografia	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Reactores de discos biológicos com a configuração de discos apoiados num eixo horizontal (A) e com a configuração de tambor (B)	3
Figura 1.2 – Exemplos de coberturas de discos biológicos	5
Figura 1.3 – Representação esquemática dos processos envolvidos na formação e desenvolvimento de biofilmes	8
Figura 1.4 – Imagens de microrganismos existentes em processos de tratamento de águas residuais (A – Bactéria <i>E. coli</i> com morfologia de bacilo; B – Bactéria filamentosa <i>Beggiatoa</i> ; C – Rotífero; D – Cianobactérias; E, F – Protozoários ciliados das espécies <i>Vorticella convallaria</i> (E) e <i>Opercularia</i> sp. (F)).....	16
Figura 1.5 - Microfotografias da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> obtidas por SEM (A) e por microscopia de epifluorescência (B)	20
Figura 1.6 – Exemplos de micrografias obtidas pela técnica FISH associada à microscopia de epifluorescência (A) e associada à CLSM (B)	23
Figura 4.1 – Instalação piloto (1 – Solução de alimentação de substrato; 2 – Bombas peristálticas; 3 – Reactores de discos biológicos; 4 – Descarga de efluente; 5 – Câmara frigorífica a 4°C.)	30
Figura 4.2 – Aspecto da instalação piloto (A – Vista geral; B – Pormenor dos reactores de discos biológicos; C – Bombas peristálticas; D – Sistema de alimentação; E – Sistema de recolha de efluente.)	31
Figura 4.3 – Aparelho de refluxo de marca “G. Vittadini Recod/6”	32
Figura 4.4 – (A) - Estufa de marca “memmert”; (B) - Mufla de marca “Heraeus INSTRUMENTS”	33
Figura 4.5 – Demonstração do modo operativo para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 0,5 e 1 dia	35
Figura 4.6 – Demonstração do modo operativo para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 4 e 5 dias.....	36
Figura 4.7 – Demonstração do modo operativo para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 5 e 6 dias.....	36
Figura 4.8 – (A) - Centrífuga de marca “Hettich MIKRO 200”; (B) - Vortex de marca “Fisher Bioblock Scientific Top-Mix 11118”	37
Figura 4.9 – Esquema das amostras e das sondas nos três slides utilizados na análise FISH.....	39
Figura 4.10 – Desidratação em três soluções sucessivas de etanol (50%, 80% e 98%)	39
Figura 4.11 – Banho de água a 48°C	41
Figura 4.12 – (A) - Microscópio “Olympus BX51”; (B) - Lâmpada de fluorescência de marca “Olympus U-RFL-T”	42
Figura 5.1 – Crescimento de biofilme nos discos no Ensaio 1 (A - 0,5 dia; B - 1 dia).....	43
Figura 5.2 – Crescimento de biofilme nos discos no Ensaio 2 (A - 1 dia; B - 2 dias; C - 3 dias; D - 4 dias; E - 5 dias)	43

Figura 5.3 – Crescimento de biofilme nos discos no Ensaio 3 (A - 1 dia; B - 2 dias; C - 3 dias; D - 4 dias; E - 5 dias; F - 6 dias)	44
Figura 5.4 - Aspecto do biofilme com Id de 0,5 a 1 dia, para a sonda BET42a (Escala: 20 µm)	45
Figura 5.5 – Aspecto do biofilme com Id de 0,5 a 1 dia, para a sonda GAM42a (A), CF319a (B) e HGC69a (C e D) (Escala: 20 µm)	46
Figura 5.6 – Aspecto do biofilme com Id de 4 a 5 dias, para a sonda BET42a (A), GAM42a (B), CF319a (C) e HGC69a (D) (Escala: 20 µm)	47
Figura 5.7 – Aspecto do biofilme com Id de 5 a 6 dias, para a sonda BET42a (A), GAM42a (B e C) e CF319a (D) (Escala: 20 µm)	48
Figura 5.8 – Aspecto do biofilme com Id de 5 a 6 dias, para a sonda HGC69a (A, B e C) e LGC354mix (D) (Escala: 20 µm)	49
Figura 5.9 – Ilustração da obtenção da cor amarela.....	50

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1 - Vantagens e desvantagens gerais dos sistemas de biomassa fixa em relação aos de biomassa suspensa.....	2
Quadro 1.2 – Principais vantagens e desvantagens de discos biológicos	6
Quadro 1.3 – Características de microrganismos existentes em processos de tratamento de água residual	15
Quadro 3.1 – Resumo do Plano Experimental.....	27
Quadro 3.2 – Plano Experimental (Fase 0).....	27
Quadro 4.1 – Principais características do substrato.....	29
Quadro 4.2 – Quantidade de formamida e água <i>MilliQ</i> necessária para preparar as soluções de hibridação	40
Quadro 4.3 – Quantidade de NaCl e EDTA necessária para preparar as soluções de lavagem	41
Quadro 5.1 – Quadro resumo (Escala: 20 μ m)	52
Quadro 5.2 – Análise semi-quantitativa dos resultados da técnica FISH	54

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ARDRA – Análise dos produtos de restrição enzimática do DNA ribossomal amplificado

ARISA – Análise automatizada do espaço intergénico ribossomal

CBO₅ – Carência Bioquímica de Oxigénio (M L⁻³)

CE – Electroforese Capilar

CLSM – Microscopia Confocal de Varrimento Laser

CQO – Carência Química de Oxigénio (M L⁻³)

DGGE – Electroforese em gel de gradiente desnaturante

d_p – Diâmetro médio de partículas do meio poroso (L)

EPS – Substâncias Poliméricas Extracelulares

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

FAME – Ésteres metílicos de ácidos gordos

FISH – Hibridação *in situ* de fluorescência

GC – Guanina-Citosina

Id – Idade do biofilme (T)

LH-PCR – Heterogeneidade de dimensão de fragmentos de PCR

LIF – Fluorescência induzida por laser

MAR – Microautoradiografia

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCR – Reacção em cadeia pela polimerase

PFA – Paraformaldeído

PLFA – Ácidos gordos fosfolipídicos

RAPD – Amplificação aleatória de DNA polimórfico

rRNA – RNA ribossomal

S₀ – Concentração da solução de alimentação (M L⁻³)

SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento

SIP – Marcação de isótopos estáveis

SSCP – Polimorfismo conformacional em DNA de cadeia simples

SST – Concentração de sólidos suspensos totais (M L⁻³)

SSV – Concentração de sólidos suspensos voláteis (M L⁻³)

TEM – Microscopia Electrónica de Transmissão

TGGE – Electroforese em gel de gradiente de temperatura

T-RFLP – Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

V – Volume (L⁻³)

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais sobre o tratamento de águas residuais

A recolha e o tratamento da água residual são procedimentos essenciais tanto para a preservação de ecossistemas naturais como para a protecção da saúde pública. A contaminação de águas superficiais e subterrâneas por descargas de águas residuais não tratadas tem de ser evitada, de modo a que problemas como a eutrofização, a morte de seres vivos e a deterioração da qualidade das águas sejam minimizados.

A necessidade acrescida deste tratamento deveu-se ao crescimento da população humana, à urbanização e à industrialização (Kadu e Rao, 2012).

Até ao início do século XX, os sistemas de tratamento biológico existentes eram maioritariamente sistemas de biomassa fixa (Maurício, 2009). No entanto, actualmente, o tratamento biológico de águas residuais recorrendo a sistemas de biomassa suspensa, nomeadamente, ao processo de lamas activadas, é o mais comum.

1.2. Sistemas de tratamento por biomassa fixa

O aparecimento de sistemas de tratamento de águas residuais por biomassa fixa proporcionou um avanço evolutivo na história dos sistemas de tratamento, possibilitando a materialização consistente da despoluição de águas residuais (Maurício, 2009).

Os sistemas de biomassa fixa podem ser agrupados em três classes gerais: (1) sistemas de biomassa fixa não submersos, (2) sistemas de biomassa suspensa com enchimento de filme fixo e (3) sistemas de biomassa fixa aeróbios submersos (Metcalf & Eddy, 2003). Para além destes, ainda existem os sistemas de biomassa fixa anaeróbios.

Os reactores de biomassa fixa são concebidos para funcionarem na etapa de tratamento secundário, nomeadamente para tratar parcialmente (filtros rápidos, filtros anaeróbios) ou totalmente (leitos percoladores, discos biológicos, filtros submersos) a água residual previamente decantada, ou ainda, no tratamento terciário no caso de nitrificação ou desnitrificação (Ibrahim *et al.*, 2012).

Os sistemas por biomassa fixa apresentam inúmeras vantagens, face aos sistemas de biomassa suspensa, no entanto, essas variam consoante o tipo de sistema e a configuração do reactor (Kadu e Rao, 2012). O Quadro 1.1 indica as principais vantagens e desvantagens que os sistemas de biomassa fixa oferecem em comparação com os de biomassa suspensa (lamas activadas).

Quadro 1.1 - Vantagens e desvantagens gerais dos sistemas de biomassa fixa em relação aos de biomassa suspensa (Albuquerque, 2003; Berland e Cooper, 2001; Kadu e Rao, 2012; Metcalf & Eddy, 2003)

VANTAGENS	DESvantagens
Elevada densidade de biomassa no material de suporte e reactores compactos devido a um grande volume específico.	Colmatação progressiva do meio, com consequente aumento de perda de carga no sistema, obrigando a lavagens periódicas e a custos associados à operação e ao consumo adicional de energia.
Tempos de retenção hidráulicos curtos e co-habitação de microrganismos em condições aeróbias e de anoxia dentro do mesmo ecossistema.	Custos de investimento relativamente elevados.
Menor sensibilidade e melhor recuperação face a choques de carga orgânica.	Necessidade de pré-tratamento eficaz.
Redução do volume de lamas e melhor qualidade no espessamento das mesmas, com um maior controlo do processo.	Produção de odores e desprendimento facilitado da biomassa (no caso dos leitos percoladores).
Inexistência de problemas de <i>bulking</i> nos decantadores secundários.	
Necessidades energéticas inferiores.	
Operação e manutenção simples, com uma reduzida manutenção de equipamentos.	
Não requer uma operação especializada e contínua.	

Antes do século XX, surgiram os primeiros sistemas de biomassa fixa, os filtros tradicionais, sendo utilizados inicialmente apenas como *screening device*, no entanto, nestes sistemas o tratamento não era somente físico mas também biológico. Mais tarde, já no início do século XX (Metcalf & Eddy, 2003), surgiram os leitos percoladores, onde o biofilme se fixa e cresce num meio de suporte (pedras ou peças de plástico) e a água residual circula no sentido descendente do reactor, isto é, a água a tratar é distribuída pelo topo do leito e percola por este (Jeppsson, 1996). Por fim, os discos biológicos foram utilizados pela primeira vez em 1928 como tecnologia de remediação através de biofilmes (Winkler, 1981; citado por Kadu e Rao, 2012). No entanto, a primeira instalação à escala real de discos biológicos foi instalada na Alemanha em 1958, devido à generalização na utilização do plástico, proporcionando uma expansão desta tecnologia (Dutta, 2007).

Actualmente, os sistemas de biomassa fixa ganharam de novo protagonismo, nomeadamente com os biofiltros, ou em combinações com biomassa em suspensão, denominados de sistemas híbridos (Maurício, 2009).

O princípio do processo de tratamento por biomassa fixa baseia-se na formação de um filme biológico que cresce aderido a um meio de suporte sólido e inerte, sendo o biofilme responsável pela remoção da matéria orgânica e/ou nutrientes presentes na água residual. O tratamento ocorre quando a água a tratar entra em contacto com o referido biofilme (Ibrahim *et al.*, 2012).

Nos biofiltros conjugam-se dois mecanismos, nomeadamente a filtração superficial dos sólidos em suspensão, e a oxidação biológica da matéria orgânica e/ou nutrientes existentes na água residual a tratar (Berland e Cooper, 2001). Geralmente, estes sistemas caracterizam-se por um reactor de fluxo ascendente, descendente ou misto, parcialmente preenchido por um leito com material de enchimento

natural ou sintético, de altura variável (entre 0,15 m e 1,50 m), cujas partículas apresentam um diâmetro médio (d_p) entre 2,0 mm e 6,0 mm, um possível sistema de recirculação e um decantador final, podendo este último ser opcional. Em relação ao arejamento, este pode ser natural ou induzido, através de difusores que podem estar instalados na base ou a cerca de dois terços do comprimento do leito (filtro total ou parcialmente arejado, respectivamente). Para os sistemas que apresentem uma elevada capacidade de filtração, poder-se-á considerar a não existência de uma unidade de decantação a jusante, recorrendo-se assim, a um sistema de lavagem, geralmente em contra-corrente para a remoção dos sólidos retidos (Albuquerque, 2003).

1.2.1. Discos Biológicos

Os discos biológicos são uma adaptação única de um sistema de biomassa fixa, uma vez que o meio de suporte é móvel (Kadu e Rao, 2012), sendo estes utilizados principalmente para o tratamento secundário de águas residuais domésticas e industriais (Ghawi e Kriš, 2009).

Neste tipo de sistema é comum aparecerem duas configurações diferentes, nomeadamente, uma onde o meio de suporte dos discos está apoiado num eixo horizontal, ou outra onde existe um tambor rotativo que se encontra preenchido com um material leve (e.g. plástico) que servirá de meio de suporte (Ibrahim *et al.*, 2012). Na Figura 1.1 é possível observar-se as diferentes configurações referidas de discos biológicos.

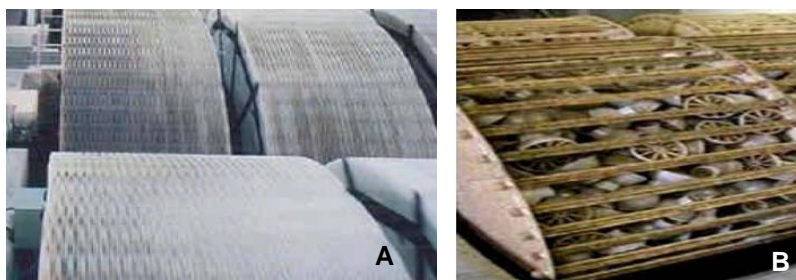


Figura 1.1 – Reactores de discos biológicos com a configuração de discos apoiados num eixo horizontal (A) e com a configuração de tambor (B) (Adaptado de Cortez *et al.*, 2008)

A configuração base de reactores de discos biológicos caracteriza-se por um meio de suporte circular que é constituído por um conjunto de discos paralelos entre si (usualmente de plástico) que rodam em torno de um eixo horizontal parcialmente submerso em água residual (cerca de 40%). Deste modo, uma parte dos discos encontra-se imersa em água residual e a outra em contacto com o ar (Kadu e Rao, 2012). Este sistema de tratamento também inclui um tanque onde se encontram os discos, as etapas de tratamento preliminar e tratamento primário, e ainda, um decantador secundário a jusante dos discos (Metcalf & Eddy, 2003).

A água residual previamente decantada entra em contacto com os discos e sobre os mesmos fixa-se e cresce um filme biológico. Assim, os microrganismos presentes nesse filme são responsáveis por tratar a água, assimilando a matéria orgânica dissolvida e suspensa como substrato, multiplicando-se através deste processo. Desta forma, mantém-se uma espessura de biofilme específica (entre 1 e 3 mm) para garantir a máxima eficiência do processo (Kadu e Rao, 2012).

A rotação facilita a transferência de oxigénio para a biomassa, permitindo o seu crescimento. Para além disso, também promove a remoção da biomassa em excesso que se desprende dos discos, sendo conduzida para dentro do tanque e posteriormente encaminhada para o decantador secundário onde se efectuará a separação sólido/líquido (Kadu e Rao, 2012). Esta rotação é possível devido à existência de um motor eléctrico (accionamento mecânico) preso directamente ao centro do eixo, ou devido à acção de ar comprimido (accionamento pneumático) (Kadu e Rao, 2012), e é caracterizada por uma velocidade lenta (1,0 a 1,6 rpm) (Metcalf & Eddy, 2003).

Normalmente, esta tecnologia é constituída por diversos estágios, variando entre dois a quatro, para remoção de CBO₅ e, seis ou mais quando se pretende que ocorram processos de nitrificação. Os estágios caracterizam-se pela compartimentação de um único tanque através de anteparas ou deflectores, havendo uma separação entre as baterias de discos, ou, pelo uso de tanques separados fisicamente e em série (Metcalf & Eddy, 2003). O uso de estágios tem como objectivo minimizar curto-circuitos e fazer com que este sistema adopte um comportamento próximo do fluxo-pistão, se se considerar a direcção do caudal afluente paralela ao eixo (Kadu e Rao, 2012). Para além do que foi referido, os estágios são especialmente importantes nos casos em que a água residual tenha uma elevada carga orgânica e se se pretender um efluente tratado com maior qualidade, isto é, se se pretender aumentar a eficiência de tratamento (Radwan e Ramanujam, 1997). Como será normal, é o primeiro estágio que recebe as cargas orgânicas mais elevadas, e também onde se regista uma eficiência de remoção de carga orgânica maior (Kadu e Rao, 2012) e, consequentemente um maior consumo de oxigénio dissolvido, por parte dos microrganismos heterotróficos (Ghawi e Kriš, 2009). Como será de esperar, os estágios seguintes recebem um afluente com uma concentração orgânica inferior à do estágio anterior (Metcalf & Eddy, 2003). Em relação aos últimos estágios, estes são normalmente utilizados para nitrificação, onde as cargas orgânicas afluentes são baixas, e após o quarto estágio, o aumento da eficiência de remoção de carga orgânica é quase insignificante (Rodgers e Zhan, 2003).

Em certos casos, como por exemplo, na remoção de azoto (desnitrificação), há necessidade que existam condições anóxicas, e para que essas condições se materializem, os discos terão que estar completamente submersos (Teixeira e Oliveira, 2001). A desnitrificação parcial também pode ser alcançada nos estágios iniciais de discos biológicos parcialmente submersos, se existir recirculação da água residual do último estágio para o primeiro, pois é onde se encontram maiores cargas orgânicas (devido ao afluente), baixos teores de oxigénio dissolvido (ambiente anóxico) e uma elevada população de microrganismos heterotróficos (Kadu e Rao, 2012).

A velocidade de rotação dos discos pode variar entre os diferentes estágios, dependendo das necessidades de oxigénio nos mesmos, de modo a otimizar a eficiência de tratamento do processo, bem como, para permitir a variação das forças de atrito que poderão promover o desprendimento da biomassa. Este mecanismo pode ser usado como controlo da espessura do biofilme. Caso se verifique velocidades periféricas elevadas, poderá ocorrer o desprendimento do biofilme e, consequentemente, limitações de substrato para que o biofilme se desenvolva adequadamente. Assim, não se pode adoptar

um valor muito elevado para a velocidade rotacional e o tamanho dos discos tem de ser limitado (Kadu e Rao, 2012).

Praticamente todas as unidades de discos biológicos encontram-se cobertas, com o objectivo de proteger o biofilme da exposição às condições climatéricas mais extremas, como também para prevenir o crescimento de algas no sistema. Outro aspecto importante, é o facto da protecção dos discos de plástico contra a exposição directa aos raios UV (Kadu e Rao, 2012). Para além destas razões, a colocação destes sistemas dentro de edifícios (instalações de grande dimensão) também permite melhorar o acesso e, proteger os discos e o inerente equipamento (Metcalf & Eddy, 2003). A cobertura também proporciona um melhor controlo de odores, reduz a perda de carga e aumenta a taxa de oxidação do processo, devido a um maior controlo da temperatura (Ibrahim *et al.*, 2012). A Figura 1.2 mostra dois exemplos de reactores de discos biológicos cobertos.



Figura 1.2 – Exemplos de coberturas de discos biológicos
(Fonte: <http://www.npswastewater.com/rotating%20biological%20contactors.htm>;
<http://www.gpsd.dst.il.us/tourmain.htm>)

Segundo Kadu e Rao (2012), o desempenho geral deste sistema de biomassa fixa para a remoção de nutrientes da água residual depende de diversos factores, tais como:

- Características da água residual afluyente (carga hidráulica, carga orgânica, pH)
- Configuração do sistema (velocidade de rotação, volume específico dos discos, percentagem de imersão dos discos, número de estágios, taxa de recirculação, mecanismos de accionamento, disposição do eixo (eixo comum com uma única velocidade ou eixos separados para cada estágio))
- Taxa de transferência de oxigénio
- Temperatura ambiente e da água residual
- Densidade média

A taxa de transferência de oxigénio e a temperatura dependem do próprio controlo do sistema, sendo considerados como os factores físicos de maior importância para a eficiência global de tratamento do sistema de discos biológicos (Kadu e Rao, 2012).

No Quadro 1.2 apresentam-se as principais vantagens e desvantagens de um sistema de discos biológicos.

Quadro 1.2 – Principais vantagens e desvantagens de discos biológicos (Cortez *et al.*, 2008; Ghawi e Kriš, 2009)

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Sistema compacto (reduzidas áreas de implantação).	Processo de arranque lento.
Operação económica, devido a uma elevada eficiência de transferência de oxigénio, resultando em consumos energéticos baixos.	Problemas mecânicos na estrutura do meio de suporte, devido a sobrecargas.
Simplicidade no controlo do processo e na monitorização.	Necessidade de tratamento primário adequado e de decantador secundário.
Adaptabilidade significativa a choques de carga hidráulica e carga orgânica.	Problemas de odor, particularmente no primeiro estágio causados por cargas orgânicas excessivas.
Boa capacidade de adaptação à presença de tóxicos.	Flexibilidade do processo limitada.
Concentração elevada de biomassa por volume de reactor.	
Excelente qualidade das lamas, apresentando uma boa sedimentação.	
Recirculação de lamas desnecessária.	
Fácil construção e expansão, com possibilidade de construção por fases.	
Estabilidade do processo.	

1.3. Biofilmes

1.3.1. Introdução

Em termos de permanência em diversos ambientes, as bactérias são as formas de vida mais bem-sucedidas, sendo os biofilmes, um dos seus mecanismos de sobrevivência (Costerton *et al.*, 1995). Os biofilmes são uma adaptação estratégica das bactérias quando expostas a situações de *stress* ambiental (factores agressivos externos) (Ikuma *et al.*, 2013).

As culturas fixas são menos susceptíveis às alterações das condições ambientais (temperatura, pH, concentrações de nutrientes, produtos metabólicos e substâncias tóxicas) em comparação com as culturas em suspensão (Lazarova e Manem, 1995). Assim, os microrganismos na forma de biofilme tornam-se mais resistentes às condições de *stress*, como por exemplo, à acção de agentes antimicrobianos (Li *et al.*, 2009). Esta situação deve-se, essencialmente, à existência da matriz polimérica na sua constituição, uma vez que esta tem o potencial de prevenir o acesso físico de algumas substâncias, servindo de barreira, impedindo a difusão das mesmas para o interior dos biofilmes (Allison, 2003). Outro motivo para a referida resistência pode ser explicada pelo facto das bactérias apresentarem uma enorme flexibilidade de expressão de genes quando sujeitas a alterações ambientais (Jefferson, 2004).

Para se garantir uma eficiência adequada nos sistemas de tratamento por biomassa fixa é essencial compreender a natureza dinâmica e as características dos biofilmes, uma vez que estes desempenham a função crucial nestes processos. Assim, o estudo destes microrganismos e das suas interações com o ambiente é de extrema importância. Um dos parâmetros fundamentais para a caracterização de biofilmes do ponto de vista do tratamento de água residual é a estimativa da biomassa activa ou da actividade dos biofilmes, tendo este parâmetro uma influência directa na taxa de degradação do substrato (Lazarova e Manem, 1995).

1.3.2. Conceito

Um biofilme pode ser definido como um sistema de estrutura coerente, onde as células microbianas aderem-se umas às outras numa superfície sólida. Estas células encontram-se envolvidas numa matriz auto-produtiva de Substâncias Poliméricas Extracelulares (*Extracellular Polymeric Substance* - EPS), isto é, uma aglomeração polimérica geralmente composta por DNA extracelular, proteínas e polissacarídeos (Ibrahim *et al.*, 2012).

1.3.3. Composição

Os principais componentes de um biofilme são os microrganismos (de uma ou mais espécies), os seus produtos de excreção (EPS) e água (Allison, 2003). A água é o principal constituinte, representando cerca de 80 a 95% da sua composição. Os microrganismos apenas representam uma fracção inferior a 10% e as EPS representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica seca do biofilme (Machado, 2005).

A distribuição espacial destes componentes com a matriz do biofilme pode influenciar as funções do mesmo e a sua relação com o ambiente aquático (Ibrahim *et al.*, 2012).

A composição química da matriz polimérica é bastante heterogénea e complexa, no entanto, os polissacarídeos são a substância predominante (Lazarova e Manem, 1995). Esta matriz caracteriza-se por um aspecto gelatinoso (Allison, 2003), sendo responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes, e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos mesmos (Flemming e Wingender, 1999; citado por Machado, 2005). A sua estrutura e composição são função da idade dos microrganismos e das condições ambientais (Lazarova e Manem, 1995).

A composição dos biofilmes depende das condições do meio, tais como, temperatura, pH, oxigénio dissolvido, composição do meio e pressão (Flemming, 1991; citado por Machado, 2005; O'Toole *et al.*, 2000), podendo até incluir partículas sólidas (argilas, areias, partículas orgânicas) provenientes do meio líquido onde está imerso (Characklis e Marshall, 1989; Wimpenny *et al.*, 1993; citado por Machado, 2005). Esta composição não depende exclusivamente das condições físico-químicas, mas também, da composição da comunidade e do estado fisiológico das células (Lazarova e Manem, 1995).

1.3.4. Formação

Os biofilmes surgem em diversas superfícies, podendo prevalecer em ambientes naturais, industriais e hospitalares (Ibrahim *et al.*, 2012). A acumulação de biofilmes em superfícies trata-se de um fenómeno que ocorre naturalmente em meios aquosos, sendo resultado da simultaneidade de processos físicos, químicos e biológicos (Machado, 2005).

A formação de biofilmes é caracterizada por quatro fases, nomeadamente (Xavier *et al.*, n. d.):

1. *Adesão inicial (reversível)* – Contacto inicial entre células microbianas planctónicas do meio líquido com uma superfície sólida, e sua subsequente fixação;
2. *Fixação irreversível* – Crescimento e divisão de células fixas através do fornecimento de nutrientes provenientes do líquido circundante, associado à produção e excreção de EPS;
3. *Maturação* – Adesão de células microbianas planctónicas, entre outras partículas, contribuindo para a acumulação de biofilme (formação de colónias);
4. *Dispersão* – Libertação de porções de biomassa por diversos mecanismos: (a) erosão superficial (perda de células individuais), (b) descolamento (*sloughing*), (c) abrasão e (d) predação e competição.

A Figura 1.3 mostra as diferentes fases na formação e desenvolvimento de biofilmes.

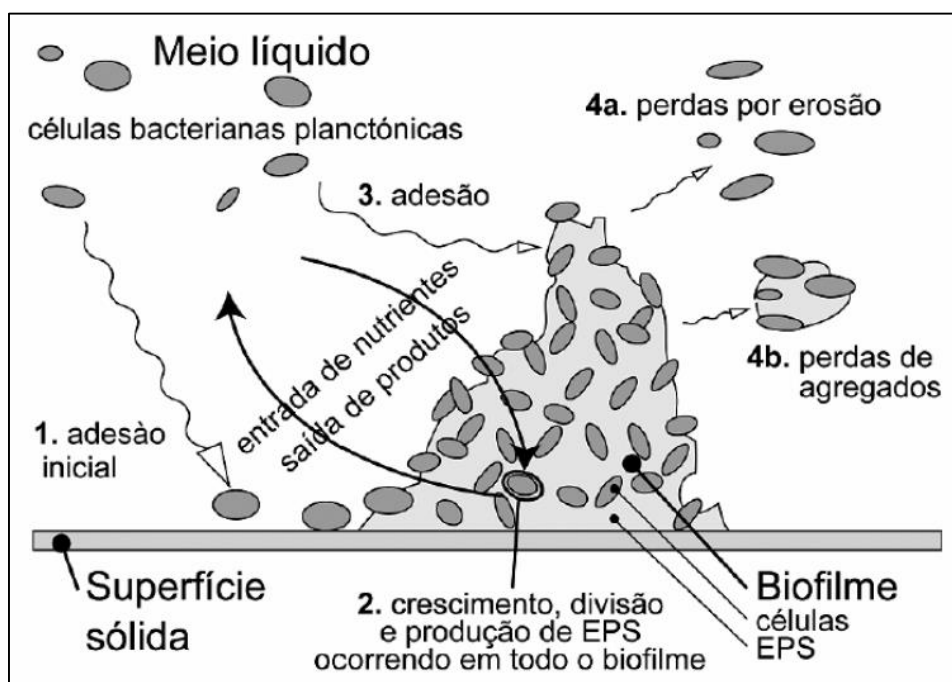


Figura 1.3 – Representação esquemática dos processos envolvidos na formação e desenvolvimento de biofilmes (Adaptado de Xavier *et al.*, n. d.)

Este processo de formação caracteriza-se por mecanismos de transporte por advecção e difusão, seguidos de adesão e consolidação através de ligações físico-químicas (Criddle *et al.*, 1991 e Grady Jr. *et al.*, 1999; citado por Albuquerque, 2003).

1.3.4.1. Principais factores que influenciam a formação de biofilmes

A formação e o desenvolvimento de biofilmes estão dependentes de uma variedade de factores, contribuindo para a heterogeneidade destas estruturas. Entre esses factores destacam-se os seguintes (Jubilado, 2010):

- Características dos microrganismos;
- Temperatura;
- pH;
- Hidrodinâmica (velocidade e turbulência) do fluído;
- Características do meio líquido circundante, em termos de concentração e qualidade de nutrientes;
- Presença de partículas inorgânicas;
- Tipo de material e rugosidade da superfície sólida;
- Presença de agentes antimicrobianos, tipo e concentração.

Na formação de biofilmes, os microrganismos seleccionados são fortemente influenciados pelos parâmetros físico-químicos referidos na lista anterior, bem como, por parâmetros operacionais como o tempo de residência. Para além disso, as diferentes características dos microrganismos afectam a formação de biofilmes, pois essa formação depende principalmente da capacidade de produção de EPS, sendo este o factor biológico mais importante neste processo (Li *et al.*, 2009). Caso um microrganismo demonstre uma maior capacidade para produção dessas substâncias, esse microrganismo tem uma maior facilidade na aderência a superfícies sólidas, através da ligação entre as cadeias de polímeros (situadas na parede celular) e a superfície (Machado, 2005). Outras características, tais como espécie, carga, hidrofobia e presença de apêndices superficiais (*pili*, fímbrias, flagelos) também têm influência na adesão inicial do biofilme às superfícies (Bower *et al.*, 1996; Chmielewski e Frank, 2003).

A temperatura é um dos principais factores no desenvolvimento microbiano, influenciando de modo significativo a formação e actividade nos biofilmes. Assim, para temperaturas afastadas do valor óptimo, constata-se uma diminuição na taxa metabólica dos microrganismos e, consequentemente, uma redução na sua taxa de reprodução (Boari *et al.*, 2009). Cada microrganismo possui uma temperatura óptima para o seu desenvolvimento (Stanier *et al.*, 1995).

O pH tem, igualmente, um efeito preponderante no metabolismo microbiano, afectando significativamente o desenvolvimento e a actividade de biofilmes. A formação da maioria dos biofilmes dá-se para valores de pH próximos da neutralidade (Pereira, 2001).

A repulsão electrostática entre os microrganismos e as superfícies sólidas pode ser alterada devido ao pH, pois este factor tem influência nas propriedades eléctricas dos microrganismos e das superfícies. Consequentemente, o processo de adesão destes também pode ser afectado (Chaves, 2004; Pereira, 2001).

O tipo de material também desempenha um papel importante na formação de biofilmes e, principalmente, na sua adesão, devido ao facto de diversos materiais onde os microrganismos aderem possuírem irregularidades. A rugosidade do material de suporte também é uma característica a ter em consideração, especialmente na adesão da primeira camada de microrganismos, uma vez que esta pode ter uma influência benéfica na retenção dos mesmos. Dado que um material rugoso possui cavidades que permitem o alojamento de microrganismos, estes tornam-se menos susceptíveis às forças de atrito, proporcionando-lhes protecção (Machado, 2005).

1.3.5. Estrutura

A estrutura interna do biofilme é considerada heterogénea (Lazarova e Manem, 1995), no entanto, até à década de 80 considerou-se que os biofilmes possuíam uma estrutura plana e com uma espessura relativamente constante (Costerton *et al.*, 1981).

A estrutura dos biofilmes pode ser descrita através de propriedades morfológicas, incluindo a espessura, densidade e forma da superfície do biofilme (Xavier *et al.*, n. d.). Além disso, a estrutura dos mesmos influencia fortemente a sua actividade (Viana, 2006).

Diversos factores influenciam esta estrutura, nomeadamente, físicos, biológicos e químicos. Entre os factores físicos destacam-se a força hidrodinâmica, a transferência de massa, o desprendimento, a textura do substrato e o material particulado, enquanto a concentração e o tipo de substrato são alguns dos factores químicos. Em relação aos parâmetros biológicos destacam-se a fisiologia das células, a população microbiana e as substâncias poliméricas extracelulares (Wijeyekoon *et al.*, 2004).

Devido ao facto dos biofilmes serem constituídos essencialmente por água, estes apresentam uma estrutura porosa e muito adsorvente (Machado, 2005). Essa porosidade permite a transferência (difusão) dos nutrientes até o interior do biofilme (Yang *et al.*, 2001). A profundidade de penetração depende principalmente da sua porosidade, mas também da concentração de substrato no líquido circundante, da transferência de massa na interface biofilme-líquido e da taxa de reacção do biofilme. Para substratos poucos solúveis, tais como o oxigénio, a profundidade de penetração é maioritariamente superficial (Denac *et al.*, 1983; citado por Ibrahim *et al.*, 2012).

Como consequência da heterogeneidade do biofilme, os nutrientes penetram à mesma profundidade em diferentes localizações com taxas distintas, afectando assim, a dinâmica de transferência de massa, bem como, a distribuição espacial da actividade microbiana (Yang *et al.*, 2001). O biofilme torna-se desta forma metabólica e fisiologicamente estratificado, devido à taxa de crescimento microbiano ser altamente variável, dando origem a diferentes secções no biofilme (Spormann, 2008).

O desenvolvimento da estrutura do biofilme pode ser explicado em termos de disponibilidade de substrato. Após a primeira camada estar formada, os nutrientes e o oxigénio são transportados para o interior das células essencialmente por mecanismos de difusão molecular. Assim, para concentrações (cargas) mais elevadas existem fluxos mássicos mais elevados, proporcionando uma maior disponibilidade de substrato para o crescimento de biofilme. Caso haja uma grande disponibilidade de

substrato, a região pode tornar-se saturada em microrganismos, originando estruturas pouco porosas e com uma densidade celular elevada. Por outro lado, se as concentrações (cargas) de substrato forem baixas, o fluxo é comparativamente inferior e o substrato é rapidamente esgotado na base do biofilme, onde existirá uma competição mais forte entre as células microbianas. A ausência de substrato retarda o crescimento do biofilme, resultando em estruturas altamente porosas (Wijeyekoon *et al.*, 2004).

Durante a transferência de massa, a espessura do biofilme torna-se uma barreira de difusão para as trocas físicas e químicas entre os substratos e os microrganismos, com uma consequente diminuição na taxa de crescimento (Cabije *et al.*, 2009).

A espessura do biofilme pode variar entre 100 µm e 10 mm, dependendo do volume de biomassa fixa e da disponibilidade de nutrientes, variando durante as diferentes fases de crescimento do mesmo. Este parâmetro também está dependente das condições hidrodinâmicas e das condições de operação do sistema (Metcalf & Eddy, 2003).

1.3.6. Quorum sensing

O *quorum sensing* é um mecanismo importante na formação e desenvolvimento dos biofilmes, pois este estabelece a comunicação e a interacção entre células (Viana, 2006). Este processo baseia-se na produção e envio de sinais químicos pelas bactérias que são recebidos por outras que se encontram na sua vizinhança próxima no biofilme. Assim, através deste mecanismo, os grupos de microrganismos numa proximidade espacial podem coordenar as suas actividades e o seu metabolismo (Ikuma *et al.*, 2013).

Os microrganismos presentes num biofilme podem actuar como grupos de células que cooperam entre si de modo a melhorar a sua aptidão individual através de interacções, aumentando também a eficiência e a resiliência da comunidade do biofilme (Ikuma *et al.*, 2013).

A matriz de EPS, que tem um papel crucial na coesão das células nos biofilmes, permite que as moléculas sinalizadoras se concentrem em quantidade suficiente para efectuar mudanças no comportamento celular. Em relação às populações planctónicas, os sinais químicos produzidos pelas células não estão concentrados em quantidade suficiente para provocar quaisquer alterações na expressão genética (Center for Biofilm Engineering, 2014).

A comunicação célula-célula pode regular a diferenciação de células, originando diferentes actividades nas subpopulações numa comunidade microbiana (Center for Biofilm Engineering, 2014).

1.3.7. Microrganismos mais frequentes em biofilmes (no tratamento de água residual)

Os principais microrganismos constituintes de um biofilme são as bactérias, fungos, algas e protozoários, sendo as bactérias o grupo dominante. Entre os diferentes organismos ocorrem fenómenos de predação e competição por espaço e alimento (Maurício, 2009), proporcionando-se assim um equilíbrio ecológico no sistema.

Acredita-se que a maioria das espécies bacterianas podem ser incluídas em biofilmes, no entanto, não se sabe se todas têm a capacidade de formar biofilmes de estirpe única sem o auxílio de estirpes de co-aderência (Li *et al.*, 2007).

Os protozoários apresentam igualmente um papel importante nos sistemas de tratamento biológico de água residual. Estes têm a principal função relacionada com a canalização da matéria orgânica para os níveis tróficos superiores, podendo esta ser directa ou através da predação de bactérias. Para além disso, estes microrganismos também influenciam a actividade de remineralização (Martín-Cereceda *et al.*, 2001 (b)). Os protozoários requerem um maior tempo de permanência no sistema comparativamente com as bactérias heterotróficas aeróbias. Assim, a sua presença é um bom indicador de um processo estável e sem problemas (Metcalf & Eddy, 2003).

Segundo Banks e Bryers (1991), a dominância de determinadas espécies de microrganismos num biofilme depende fortemente da sua taxa de crescimento e reprodução. Estes autores também sugeriram que os microrganismos predominantes num biofilme são aqueles que possuem uma taxa de crescimento mais elevada, no entanto, não significa que estes excluam integralmente os microrganismos que têm uma taxa de crescimento mais baixa.

Alguns autores defendem que os microrganismos gram-negativos têm uma maior capacidade no que diz respeito à adesão inicial de superfícies e à formação de biofilmes, apresentando uma vantagem competitiva relativamente aos gram-positivos. Este facto pode ser explicado devido à presença de apêndices superficiais que estes microrganismos possuem, bem como, ao seu reduzido tempo de duplicação, garantindo, dessa forma, a sua dominância (Pompermayer e Gaylarde, 2000).

Os biofilmes constituídos por diferentes espécies irão apresentar estruturas estratificadas, onde os organismos com a taxa de crescimento mais elevada encontrar-se-ão na zona exterior do biofilme (como as bactérias heterotróficas), enquanto os organismos de crescimento mais lento encontrar-se-ão no centro, mais junto ao suporte (bactérias autotróficas e nitrificantes) (Heijnen *et al.*, 1989; citado por Ibrahim *et al.*, 2012; Maurício e Amaral, 2012). Esta distribuição deve-se essencialmente à velocidade de multiplicação de cada espécie.

De acordo com Andersson *et al.* (2008), num estudo que incluía 13 estirpes de bactérias comumente encontradas em sistemas de tratamento de água residual, os microrganismos que demonstraram maior capacidade para formar biofilme foram o *Bacillus cereus* SJV e a *Comamonas denitrificans* 123. Este estudo avaliou a capacidade para formação de biofilme e as propriedades de aderência destas estirpes, que foram estudadas para culturas puras, duplas e mistas. Apesar dos melhores resultados terem sido para as duas espécies já referidas, de todas as culturas puras analisadas em água residual, o

microrganismo *Acinetobacter calcoaceticus* foi o que formou o biofilme mais resistente e, na cultura mista com todos os microrganismos estudados, constatou-se que a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Comamonas denitrificans* 110 e 123 foram os microrganismos dominantes. A bactéria da espécie *Pseudomonas aeruginosa* também formou biofilme em todas as culturas duplas investigadas, embora em culturas puras raramente tenha desenvolvido biofilme. Esta última observação pode indicar que esta espécie possui características favoráveis em situações de competição entre diferentes microrganismos. Por outro lado, as características apresentadas pela *Acinetobacter calcoaceticus* sugerem que esta espécie se pode tornar um potencial co-aderente, ajudando na formação de biofilme de outras bactérias, sem haver competição entre elas. Assim, microrganismos desta natureza podem ser usados como âncoras para a fixação de estirpes que apresentem problemas de aderência, podendo ter potencial aplicação em diversas indústrias.

Os microrganismos dominantes nos biofilmes de leitos percoladores são as bactérias facultativas, sendo as espécies *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Alcaligenes* as mais frequentemente encontradas neste tipo de sistema. Os protozoários são predominantemente do grupo dos ciliados, pertencentes às espécies *Vorticella*, *Opercularia* e *Epistylis* (Hawkes, 1963 e Higgins e Burns, 1975; citado por Metcalf & Eddy, 2003).

No trabalho de Neto e Costa (2011) foram apresentados os resultados de um estudo efectuado sobre o comportamento de um reactor híbrido na remoção simultânea de carbono, azoto e fósforo de uma água residual urbana. O reactor era constituído por biomassa em suspensão e fixa, dada a existência de um suporte fixo inserido num reactor de lamas activadas.

No biofilme foi verificada a presença de muitas amebas e rotíferos, sugerindo a estabilidade do sistema e as eficiências elevadas na oxidação da matéria orgânica e na nitrificação (Canler *et al.*, 1999; citado por Neto e Costa, 2011). Para além desses, também se observou, para a biomassa suspensa e para a biomassa fixa, segundo uma análise FISH, bactérias oxidantes de azoto amoniacal, do tipo *Nitrosomonas* sp. e *Nitrosococcus mobilis*, e bactérias oxidantes de nitrito, do tipo *Nitrobacter* sp., tendo também ainda sido identificadas outras β -proteobactérias. Através da análise FISH constatou-se que 80% das bactérias estavam activas (eubactérias) no biofilme.

O trabalho experimental realizado por Cabije *et al.* (2009) analisou um sistema de tratamento integrado de águas residuais por discos biológicos. O crescimento de biofilme neste sistema foi caracterizado pela selecção e sobrevivência de microrganismos desenvolvidos sob condições ambientais aeróbias e ainda pelo seu metabolismo associado à remoção de carbono, azoto e fósforo. Segundo este estudo, constatou-se que leveduras, bactérias coliformes (principalmente *Escherichia coli*), cianobactérias e diatomáceas bentónicas foram os microrganismos dominantes encontrados nos biofilmes fixos aos discos. Para além destes, protozoários e algas autotróficas, nomeadamente as espécies *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Diatoma*, *Tribonema*, *Oscillatoria*, *Euglena*, outros rotíferos com motilidade e pequenos metazoários também foram os principais microrganismos encontrados nas amostras de biofilme. No entanto, as algas surgiram principalmente no fim de cada ensaio experimental.

O estudo executado por Martín-Cereceda *et al.* (2001 (a)) examinou os microrganismos nos biofilmes presentes num sistema de discos biológicos no tratamento de uma água residual doméstica. Foi concluído que os biofilmes que se fixavam na superfície dos discos apresentavam uma elevada variedade de microrganismos, nomeadamente, bactérias filamentosas (principalmente a espécie *Beggiatoa* spp.), algas eucarióticas verdes, protozoários ciliados e pequenos metazoários (nemátodes e rotíferos). Os ciliados peritríquios demonstraram ser o grupo dominante das comunidades de protozoários e metazoários desses biofilmes. A identificação de ciliados foi caracterizada ao nível da espécie, sendo os ciliados peritríquios representados principalmente pelas espécies *Vorticella convallaria*, *Epistylis entzii*, *Carchesium polypinum*, *Vorticella infusionum* e *Opercularia articulata*. Outro estudo de Martín-Cereceda *et al.* (2001 (b)) confirmou a presença de protozoários e metazoários em biofilmes presentes em reactores de discos biológicos no tratamento de águas residuais. Nesta investigação foi efectuada uma análise sazonal, tendo-se analisado as comunidades de protozoários e metazoários predominantes para cada estação do ano. Os protozoários foram os microrganismos dominantes em todos os estágios dos discos biológicos, sendo os ciliados o grupo representativo tendo em conta todas as estações do ano.

O estudo de Kadu e Rao (2012) constatou a presença de microrganismos autotróficos, heterotróficos e protozoários em biofilmes de sistemas por discos biológicos.

O desenvolvimento de microrganismos filamentosos (principalmente bactérias) em biofilmes de discos biológicos é bastante provável, caso se adopte cargas orgânicas elevadas nos primeiros estágios. Isso leva ao crescimento destes microrganismos (considerados indesejáveis), tais como a espécie bacteriana *Beggiatoa* (bactéria oxidante de enxofre), desencadeando problemas como a espessura excessiva de biofilme, a diminuição do oxigénio dissolvido, a redução do desempenho do processo e o aparecimento de odores desagradáveis (Grady *et al.*, 1999 e Tchobanoglous e Burton, 1991; citado por Ibrahim *et al.*, 2012). No entanto, no estudo Cabije *et al.* (2009) não houve evidência desta bactéria filamentosa no biofilme analisado, ao contrário do que se observou no Martín-Cereceda *et al.* (2001 (a)).

1.3.7.1. Características dos microrganismos

No Quadro 1.3 descrevem-se algumas características dos microrganismos típicos presentes em processos de tratamento de água residual.

Quadro 1.3 – Características de microrganismos existentes em processos de tratamento de água residual (Metcalf & Eddy, 2003)

Bactérias	As bactérias são organismos unicelulares procarióticos, caracterizadas por uma estrutura celular simples. Tipicamente, a sua reprodução dá-se por divisão binária, no entanto, certas espécies reproduzem-se sexualmente ou por gemulação (<i>budding</i>). Estes microrganismos podem apresentar diversos tipos de morfologia, nomeadamente, esférica (cocos), cilíndrica (bacilos ou bastonetes), helicoidal rígida (vibriões, espirilos) e helicoidal flexível (espiroquetas) (Lopes e Fonseca, 1996). As bactérias desempenham um papel preponderante na remoção de matéria orgânica (bactérias heterotróficas), bem como, na remoção de nutrientes, nomeadamente o azoto (bactérias nitrificantes autotróficas e desnitrificantes), e o fósforo (bactérias heterotróficas acumuladoras de fósforo) em águas residuais (Jeyanayagam, 2005).
Archaea	Organismos semelhantes às bactérias em relação ao tamanho e componentes básicos celulares. Normalmente são encontrados em ambientes de condições extremas de temperatura e composição química. Importantes em processos anaeróbios.
Fungos/ Leveduras	Os fungos são organismos eucarióticos heterotróficos, não fotossintéticos e apresentam uma estrutura multicelular. A maioria dos fungos são aeróbios obrigatórios ou facultativos. Estes organismos reproduzem-se sexual ou assexuadamente por divisão binária, gemulação ou esporulação (formação de esporos). Os bolores (“fungos verdadeiros”) produzem unidades microscópicas (hifas), que no seu conjunto formam uma massa filamentosa designada micélio. Embora as leveduras sejam fungos, estas não formam micélio e são unicelulares.
Protozoários	Os protozoários são organismos eucarióticos microscópicos, usualmente unicelulares, caracterizados por possuírem motilidade. A maioria destes microrganismos são heterotróficos aeróbios, alguns anaeróbios aerotolerantes e poucos são anaeróbios. Os protozoários são benéficos nos processos de tratamento biológico de águas residuais, dado que são predadores de bactérias e consomem matéria orgânica particulada. Geralmente apresentam um tamanho superior às bactérias.
Rotíferos	Os rotíferos são animais eucarióticos heterotróficos aeróbios. Estes são caracterizados pela existência de dois conjuntos de cílios rotativos nas suas cabeças, que lhes conferem motilidade, auxiliando também na captação de alimento. Muito eficazes no consumo de bactérias floculadas e dispersas, e de pequenas partículas de matéria orgânica. A presença de rotíferos numa água residual sugere a existência de um processo de purificação biológico aeróbio altamente eficiente.
Algas	As algas são organismos unicelulares ou multicelulares, autotróficos, eucarióticos fotossintéticos. A alga azul-verde cianobactéria é um organismo procariótico.

O tamanho dos microrganismos procarióticos está compreendido entre 0,2 e 3,0 μm , sendo estes considerados pequenos em comparação com os eucarióticos unicelulares, em que o seu tamanho está compreendido entre 2 e 100 μm (Metcalf & Eddy, 2003).

Na Figura 1.4 mostram-se exemplos de alguns microrganismos descritos anteriormente no Quadro 1.3.

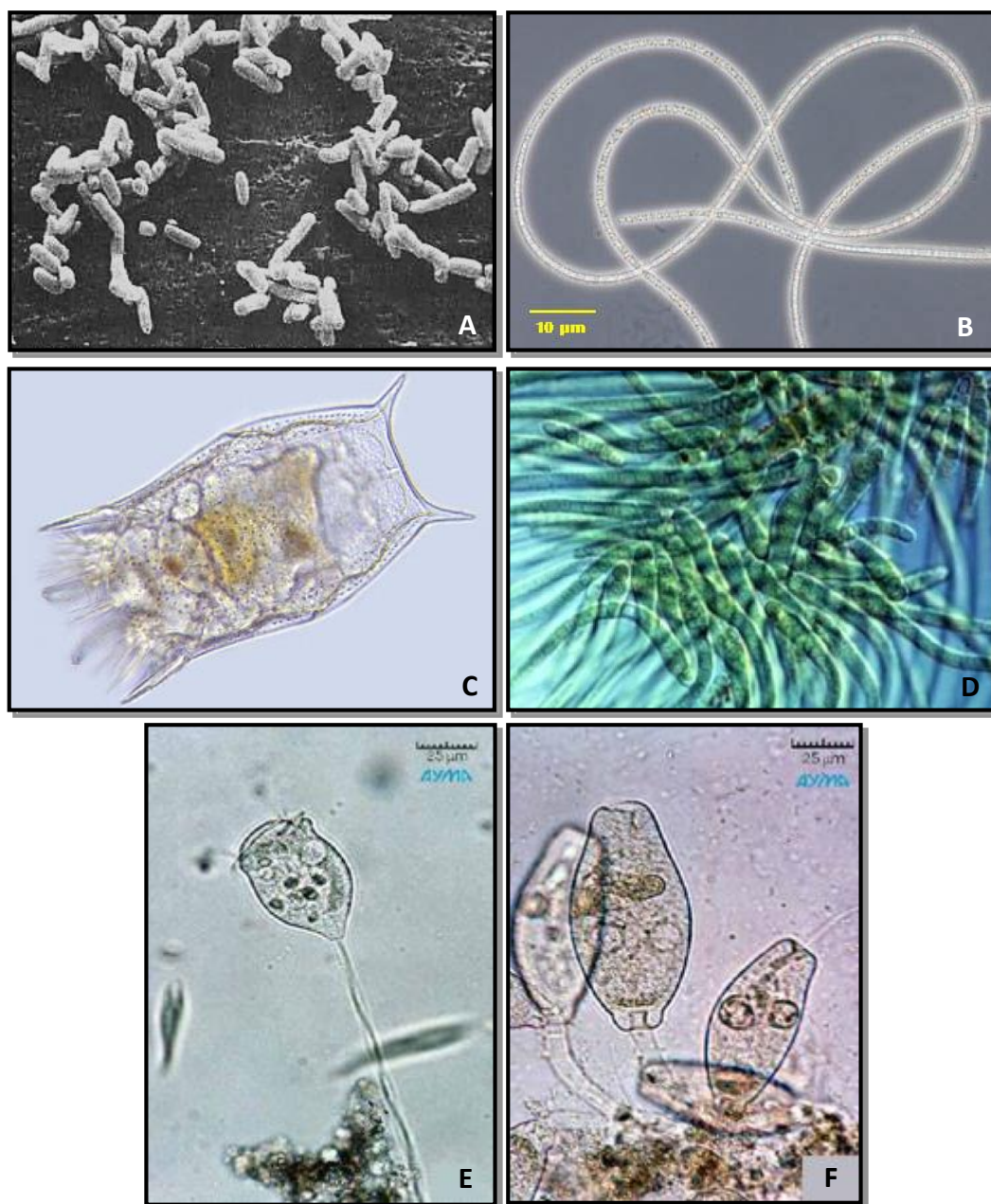


Figura 1.4 – Imagens de microrganismos existentes em processos de tratamento de águas residuais (A – Bactéria *E. coli* com morfologia de bacilo (Fonte: Metcalf & Eddy, 2003); B – Bactéria filamentosa *Beggiatoa* (Fonte: <http://eol.org/pages/90697/overview>); C – Rotífero (Fonte: <http://wastewaterbacteria.blogspot.pt/2011/07/common-bacteria-fungi-and-protozoa.html>); D – Cianobactérias (Fonte: Joseph, 2009); E, F – Protozoários ciliados das espécies *Vorticella convallaria* (E) e *Opercularia* sp. (F) (Fonte: Meireles, 2011))

1.3.8. Importância dos biofilmes

Os biofilmes apresentam diversas vantagens em diferentes áreas, tais como, indústria, ambiente e medicina. Por outro lado, estes podem ser prejudiciais, dificultando e causando problemas nessas mesmas áreas.

1.3.8.1. Aspectos benéficos

Os microrganismos associados em biofilme têm um papel crucial nos ciclos de nutrientes aquático e terrestre (Bernhard e Bowser, 1992; Paul *et al.*, 1991) e na biodegradação e transformação de poluentes ambientais (Holden *et al.*, 1997; White *et al.*, 1998).

Os biofilmes podem contribuir benéficamente para vários processos biotecnológicos, nomeadamente no tratamento de águas residuais, facilitando a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas (Machado, 2005). Outra aplicação da tecnologia de biofilmes que se torna vantajosa é na biorremediação de ambientes contaminados, pois estes microrganismos formam naturalmente bio-barreiras prevenindo a contaminação de ambientes como o solo e a água subterrânea (Singh *et al.*, 2006).

O principal benefício do uso de biofilmes na remoção de poluentes de águas residuais deve-se às propriedades da matriz polimérica. Isto porque esta é responsável pela captura e imobilização de contaminantes orgânicos e inorgânicos (agentes patogénicos, metais pesados e nanopartículas) presentes na água poluída, sendo necessária a sua remoção (Peulen e Wilkinson, 2011; Searcy *et al.*, 2006; Unz e Shuttleworth, 1996).

1.3.8.2. Aspectos prejudiciais

Em certas situações o crescimento de biofilmes torna-se prejudicial. Estes microrganismos podem originar diversos problemas em vários sectores industriais, como por exemplo, corrosão de equipamentos e redução da capacidade de transferência de calor entre superfícies. Também podem provocar contaminação de produtos, perdas energéticas e perdas de pressão (Jass e Walker, 2000; citado por Viana, 2006). Estes efeitos adversos contribuem para um impacto negativo a nível económico no sector industrial, devido à redução de desempenho dos processos, à diminuição da eficiência de operação dos equipamentos e às despesas acrescidas de limpeza e de manutenção pela substituição precoce de peças deterioradas dos equipamentos (Characklis e Marshall, 1989).

Os biofilmes também podem ser prejudiciais para a saúde humana, originando o aparecimento de cáries dentárias, pelo seu desenvolvimento nos dentes, e de outras doenças que podem provocar infecções graves (Machado, 2005). A acumulação de biofilmes nos tubos e válvulas de redes de abastecimento de água, deteriorando a qualidade da mesma, também aumenta os riscos para a saúde pública (Characklis e Marshall, 1989).

1.4. Métodos existentes para a identificação de microrganismos

Os métodos tradicionais (métodos *ex situ* ou métodos dependentes de cultura) adoptados para a caracterização microbiana são baseados em técnicas de cultura, isolamento e identificação através do estudo das características morfológicas, fisiológicas e metabólicas. Ao longo do tempo verificou-se que estas metodologias não se tornavam práticas do ponto de vista ambiental, pois o processo de recolha de microrganismos em amostras ambientais podia ser extremamente difícil. Essa dificuldade devia-se ao facto destes métodos imporem a recolha dos microrganismos no seu habitat com posterior cultura, isolamento e identificação (Rosário, 2009).

Embora estas técnicas sejam indispensáveis para estudos de crescimento, morfologia, fisiologia, entre outros, é conhecido o facto de apenas uma percentagem mínima (0,01 – 10%) de microrganismos de uma amostra ambiental ser crescida em cultura pura, contribuindo para uma reduzida fiabilidade dos resultados, sobretudo na representação da biodiversidade presente (Amann *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 2007; Holben *et al.*, 2004; Rosário, 2009).

Assim, as técnicas moleculares (métodos *in situ* ou métodos independentes de cultura) vieram revolucionar as técnicas clássicas, oferecendo metodologias mais fidedignas e exactas na caracterização e determinação de comunidades microbianas. Estes métodos para além de possibilitarem a detecção de microrganismos no ambiente não sendo necessária a sua remoção do habitat, permitem também a detecção de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis (Rosário, 2009).

1.4.1. Métodos *ex situ*

As técnicas de cultivo baseiam-se em diluições sucessivas das suspensões de células, proporcionando-se o crescimento das mesmas em meio sólido de modo a se obter colónias isoladas. Estas, posteriormente, são submetidas a testes bioquímicos (*e.g.* teste API) e fenotípicos para identificação das espécies presentes (Prosser, 2002).

Através desta técnica é possível detectar-se os microrganismos, após incubação, com base no crescimento celular e quantificá-los pela contagem do número de colónias existentes, assumindo que cada organismo presente na amostra original produz uma colónia (UFC – Unidades Formadoras de Colónias) (WS Atkins Environment, 2000).

O advento de métodos relativos à caracterização da actividade metabólica microbiana, tais como os baseados em testes colorimétricos (e.g. microplacas do sistema Biolog Inc, USA) (Garland e Mills, 1991) proporcionou uma melhoria na identificação de microrganismos, pois contribuiu para o aumento de informação relativamente ao potencial metabólico de uma comunidade em análise. O sistema Biolog utilizado para a detecção e identificação de microrganismos, nomeadamente bactérias e fungos, baseia-se numa técnica de microplacas e diz respeito à capacidade dos microrganismos para utilização de substratos específicos ou para a capacidade de crescimento em certas condições ambientais. Deste modo, essa identificação é feita pela correspondência do perfil de utilização dos substratos por uma cultura de bactérias (de uma única espécie ou estirpe) com os perfis de utilização associados a tipos conhecidos. Este sistema não se aplica a microrganismos não cultiváveis, pois é baseado no seu crescimento (Rosário, 2009).

Outra técnica aplicada na detecção e identificação de microrganismos, tais como a bactérias e a fungos, é a Análise de Ácidos Gordos, em que os microrganismos são identificados com base no tipo e quantidade relativa de moléculas de ácidos gordos presentes nas suas membranas (Kozdrój e van Elsas, 2001). A identificação é possível dado que os ácidos gordos individuais encontram-se distribuídos aleatoriamente entre os diferentes *taxa* microbianos, permitindo assim que cada *taxon* individual possua um *fingerprint* de ácidos gordos diferente. Esta técnica possibilita a obtenção de um perfil da comunidade, podendo ser aplicada segundo duas análises, ou por perfis de ácidos gordos fosfolipídicos (PLFA) ou por perfis de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (Kozdrój e van Elsas, 2001; Rosário, 2009).

1.4.2. Métodos *in situ* não moleculares

Nestes métodos estão incluídas as técnicas baseadas em microscopia e em colorimetria.

Relativamente às técnicas de microscopia mais usuais para a análise de amostras ambientais, incluem-se a microscopia em contraste de fase, microscopia de epifluorescência, microscopia electrónica de varrimento (SEM) e microscopia electrónica de transmissão (TEM). A microscopia de contraste de fase é usada principalmente para contagem directa. A microscopia de epifluorescência é usada essencialmente para a enumeração de microrganismos (abrangendo células viáveis e não viáveis), baseando-se na coloração de ácidos nucleicos com fluorocromos, usualmente o laranja de acridina (dicloridrato de acridina-3,6-diamina) e o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Os tipos de microscopia electrónica SEM e TEM são utilizados na detecção e caracterização de microrganismos. O SEM é frequentemente utilizado no estudo de biofilmes, dado que esta técnica de microscopia permite a análise de associações entre células. Para além disso, também é usado na determinação do aspecto da superfície das células microbianas. O TEM tem aplicação maioritária na detecção e identificação de vírus, devido ao seu maior poder de resolução (Rosário, 2009).

Na Figura 1.5 mostram-se dois exemplos de imagens possíveis de se obter pela aplicação de duas técnicas microscópicas anteriormente mencionadas.

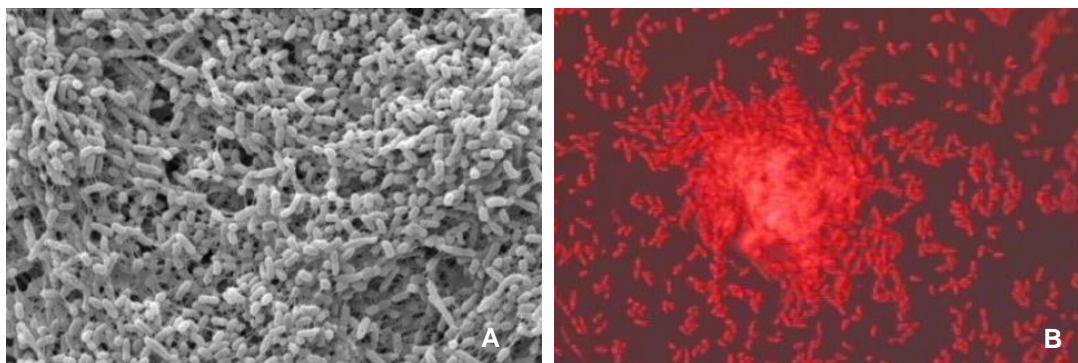


Figura 1.5 - Microfotografias da bactéria *Pseudomonas fluorescens* obtidas por SEM (A) (Adaptado de Machado, 2005) e por microscopia de epifluorescência (B) (Adaptado de Viana, 2006)

As técnicas de colorimetria permitem identificar microrganismos pelo uso de um composto que modifica a sua coloração na presença dos mesmos, possibilitando, através do uso de diferentes compostos, a distinção entre diferentes *taxa* microbianos e também entre microrganismos em estados metabólicos distintos. As células microbianas podem ser analisadas por citometria de fluxo, sendo esta técnica adequada para quantificar componentes ou características estruturais das células através de observações microscópicas (Rosário, 2009).

1.4.3. Métodos *in situ* moleculares

Anteriormente à aplicação de determinados métodos de análise de *fingerprinting*, ou de análise filogenética, para amostras ambientais, é necessário proceder-se à extracção dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), com posterior amplificação dos fragmentos de DNA por PCR (Rosário, 2009).

Não existe nenhum método universal para a extracção de DNA de comunidades consoante a sua origem (Chaudhuri *et al.*, 2006). No entanto, a extracção pode ser conseguida através da ligação do ácido nucleico a uma matriz sólida incluída em *kits* comerciais, com o intuito de excluir primeiro os contaminantes e depois libertar o ácido nucleico (Talbot *et al.*, 2008).

A amplificação é o processo geralmente usado nos métodos baseados em DNA, excepto na hibridação do DNA com sondas, através da técnica de reacção em cadeia pela polimerase (PCR) de marcadores genéticos com dois *primers* universais aptos para amplificar os genes alvo de uma elevada variedade de organismos distintos (Rosário, 2009). A sequência que codifica o gene de rRNA 16S tem contribuído fortemente para a avaliação da diversidade microbiana, proporcionando a identificação dos procariotas e a previsão das relações filogenéticas (Kirk *et al.*, 2004). Com o uso de métodos que utilizam produtos PCR é necessário ter especial atenção, pois existe a possibilidade de aparecimento de artefactos que podem induzir a uma conclusão exagerada relativamente à diversidade presente nas comunidades microbianas. Entre os artefactos de PCR podem estar incluídos a amplificação preferencial de determinados tipos de sequências, a formação de sequências quiméricas e falsos positivos devido a contaminação experimental (Pontes *et al.*, 2007). Por estas razões, os parâmetros calculados por

fingerprints devem ser interpretados como uma indicação e não como uma medida absoluta do grau de diversidade numa comunidade bacteriana (Marzorati *et al.*, 2008). Uma alternativa para evitar os enviesamentos do PCR é a detecção directa das moléculas de rRNA sem amplificação. Dado que estas moléculas são transcriptas apenas em células activas metabolicamente, sendo rapidamente degradadas quando o metabolismo termina, a análise directa delas pode apresentar a diversidade e até quantificar os organismos metabolicamente activos (Lau e Liu, 2007).

Os métodos de análise de *fingerprinting* resultam do estudo de perfis de bandas de produtos PCR em géis, sendo adoptados para a detecção de diferenças entre comunidades microbianas (Dahllöf, 2002) e na avaliação de alterações na estrutura das comunidades em resposta a condições de *stress* ambiental (Chabaud *et al.*, 2008).

Para se obter uma rápida pesquisa e comparação das comunidades microbianas e da sua diversidade, a adopção de métodos de *profiling* genotípico é a escolha ideal. O principal objectivo destes métodos é fornecer um padrão global da comunidade. Entre os diversos existentes enumeram-se os frequentemente usados, tais como, a análise dos produtos de restrição enzimática do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), a análise automatizada do espaço intergénico ribossomal (ARISA), a análise de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (T-RFLP), a electroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e com gradiente de temperatura (TGGE), a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), a análise de polimorfismos conformacionais em DNA de cadeia simples por PCR (PCR-SSCP), a hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) e métodos associados, e a técnica LH-PCR (Rosário, 2009).

O método ARDRA tem uma aplicação mais adequada para comparações entre comunidades simples, apresentando uma resolução relativamente baixa, enquanto o método ARISA apresenta uma resolução mais elevada na determinação da composição de comunidades, conseguindo detectar diferenças subtis nas espécies. O método SSCP apresenta uma análise comparativa rápida e o LH-PCR algumas limitações na resolução filogenética (Nocker *et al.*, 2007; Talbot *et al.*, 2008; Zoetendal *et al.*, 2004).

O método T-RFLP (uma variante do ARDRA) baseia-se numa metodologia automatizada que combina electroforese capilar (CE) com detecção por fluorescência induzida por laser (LIF), através de PCR com *primers* marcados com fluorocromos. Após a amplificação, os produtos PCR são digeridos por enzimas de restrição, produzindo fragmentos terminais marcados (Moeseneder *et al.*, 1999). Através dos dados resultantes deste método é possível identificarem-se as populações prováveis das comunidades microbianas pela comparação desses dados com os dados esperados, obtidos em bases de análise de sequências de genes de rRNA 16S já conhecidas, através do uso de diversas ferramentas na Internet (Kent e Triplett, 2002; Rosário, 2009). De todos os métodos, este é o único que não recorre à sequenciação posterior dos fragmentos para a informação filogenética (Kent e Triplett, 2002), sendo possivelmente o mais reprodutível (Katsivela *et al.*, 2005).

A DGGE/TGGE é uma das técnicas de *fingerprinting* mais usuais para a avaliação da estrutura de comunidades microbianas complexas, em amostras ambientais (Muyzer e Smalla, 1998), demonstrando ser a opção ideal para descrever a diversidade microbiana previamente desconhecida (Nocker *et al.*, 2007). Os fragmentos de cadeia dupla de DNA resultantes da amplificação PCR são separados por electroforese em condições desnaturantes providenciadas por ureia e formamida (DGGE) ou por temperatura (TGGE). A DGGE é efectuada a temperaturas elevadas (50-60°C) num gel de acrilamida com um gradiente de desnaturação, enquanto a TGGE é através de um gradiente crescente de temperatura no gel, com uma concentração constante de reagentes desnaturantes (Rosário, 2009). A TGGE apresenta a vantagem de efectuar uma triagem rápida de todas as amostras, com uma maior eficácia relativamente à DGGE, embora a especificidade seja ligeiramente inferior (WS Atkins Environment, 2000).

Os *fingerprints* de comunidades bacterianas de amostras distintas podem ser comparados num único gel (Rosário, 2009), correspondendo o perfil DGGE ou TGGE de uma amostra a um *fingerprint* da sua comunidade. Assim, a identificação das espécies presentes numa amostra pode ser alcançada pelo estudo da posição das bandas no gel, assumindo-se que, após coloração, cada banda representa uma sequência de rDNA 16S específica para uma determinada espécie microbiana (Zhang e Fang, 2000). Desta forma, as bandas individuais seleccionadas, com mais interesse para o estudo, são excisadas do gel e identificadas através de sequenciação (Nocker *et al.*, 2007).

Este método é bastante exacto na separação de diversas espécies em condições desnaturantes, dado que é possível distinguir as mesmas espécies que diferem somente num par de bases na sequência do DNA (Muyzer, 1998; citado por Rosário, 2009). No entanto, este método apresenta algumas limitações, nomeadamente a sobreposição de bandas DGGE/TGGE com a impossibilidade da sua sequenciação directa, no caso de existir co-migração de várias sequências de rDNA 16S distintas com igual ponto de fusão e que ocupem a mesma posição no gel (Rosário, 2009). Uma solução possível para este problema será a construção de bibliotecas de clones de rDNA 16S com uma triagem subsequente dos diferentes clones por DGGE/TGGE (Talbot *et al.*, 2008). Outro obstáculo relaciona-se com o *background* da coloração, podendo surgir dificuldades na distinção do *background* e das bandas de fraca intensidade, correspondentes às espécies de menor abundância na amostra. Os programas informáticos podem aligeirar esta situação, reduzindo artificialmente o *background*, no entanto, essa conversão de nitidez na imagem pode interferir com os resultados, podendo não reflectir toda a comunidade (Nocker *et al.*, 2007).

O método FISH envolve a marcação por fluorescência de sondas oligonucleotídicas para o rRNA 16S (sequências de ácidos nucleicos específicas) no interior de células intactas com corantes filogenéticos (Rosário, 2009). Em comparação com outras técnicas, o FISH oferece a possibilidade de combinar a identificação microbiana com a quantificação e a localização espacial de microrganismos directamente nos seus habitats naturais (Wagner *et al.*, 2003). Esta técnica também consegue fornecer informação sobre a actividade metabólica dos membros de uma população desconhecida (activos e não activos; vivos ou não vivos) pela correlação das sondas com o rRNA da célula (DeLong *et al.*, 1989; Wallner *et al.*, 1993). O FISH também é muito eficiente na análise de comunidades microbianas imobilizadas, tais como biofilmes e flocos, no entanto, apresenta a desvantagem do seu estado físico de aglomeração

(Rosário, 2009), pelo que pode ser necessária a sua desagregação prévia ou a utilização de técnicas de crioseccionamento (Shiraishi *et al.*, 2008).

As principais desvantagens apresentadas por esta técnica relacionam-se com o reduzido número de sondas que são possíveis de utilizar por análise, sendo o seu desenvolvimento dependente das sequências do gene de rRNA 16S depositadas em bases de dados distintas, restringindo a técnica à especificidade taxonómica das sondas (Rosário, 2009). Para além destas limitações incluem-se outras como o número de ribossomas por célula, a acessibilidade do alvo, a permeabilização da célula bacteriana e o limite de resolução das técnicas de microscopia utilizadas na visualização das sondas marcadas (microscopia óptica de epifluorescência, microscopia confocal de varrimento laser (CLSM) e citometria de fluxo) (Zoetendal *et al.*, 2004).

A Figura 1.6 mostra dois exemplos de imagens possíveis através da técnica FISH associada a duas técnicas de microscopia.

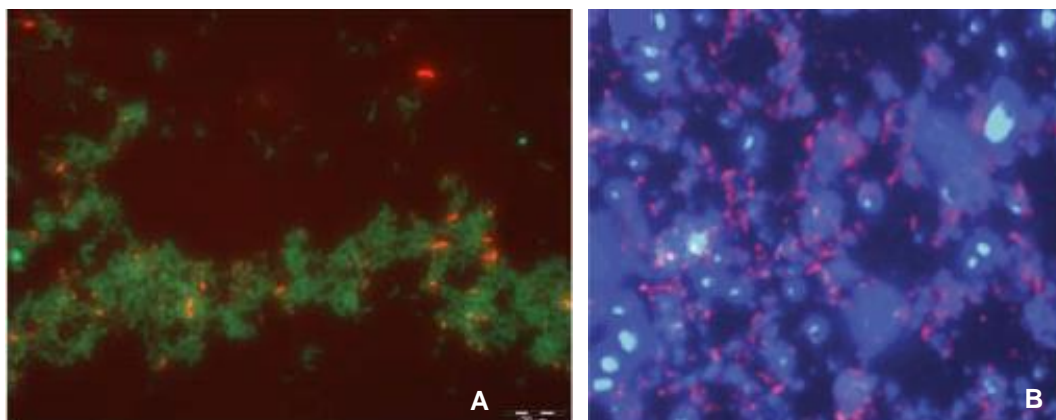


Figura 1.6 – Exemplos de micrografias obtidas pela técnica FISH associada à microscopia de epifluorescência (A) (Adaptado de Andersson *et al.*, 2011) e associada à CLSM (B) (Adaptado de Andersson *et al.*, 2008)

O método FISH pode ser associado a outras técnicas, podendo combinar-se com a microautoradiografia (MAR-FISH). A metodologia desta técnica é baseada em sondas marcadas radioativamente, permitindo correlacionar a identidade filogenética e a actividade específica relativa dos microrganismos numa comunidade microbiana complexa, ao nível monocelular (Okabe *et al.*, 2004). Outro método combinado com o FISH foi desenvolvido recentemente denominado por SEM-ISH, auxiliando-se da microscopia SEM para a detecção, identificação e enumeração de microrganismos (Kenzaka *et al.*, 2005).

A sequenciação após clonagem de genes de rRNA 16S não é o método mais eficiente para ser aplicado no estudo de comunidades microbianas, embora apresente uma boa resolução filogenética, possibilitando a identificação de espécies e a determinação da vizinhança filogenética mais próxima, a maioria das sequências dos genes de rRNA 16S está conservada entre os procariotas (Ashby *et al.*, 2007; Nocker *et al.*, 2007).

Actualmente recorre-se preferencialmente a técnicas de sequenciação de nova geração (*High-throughput sequencing*), com tecnologia *Illumina*, *Pyrosequencing* ou *Ion Torrent*, por exemplo, que

permitem a amplificação simultânea de milhares de *amplicons* de uma cultura mista, sem a sua prévia separação (anteriormente garantida pelo passo de clonagem). Os preços destas tecnologias ainda restringem um pouco o seu uso, mas estas técnicas permitem uma cobertura extensiva da diversidade microbiana de uma comunidade (Loman *et al.*, 2012; Shokralla *et al.*, 2012).

Uma melhoria nas técnicas clássicas de *fingerprinting* deu origem ao método DNA *microarrays*, pois para além de se obter um padrão da composição microbiana, este método também oferece a vantagem da identificação instantânea dos organismos detectados (Wagner *et al.*, 2007). Assim, esta técnica baseia-se num processo de hibridação entre duas cadeias de ácidos nucleicos (alvo e sonda) marcados por fluorescência, as quais hibridam se forem complementares, podendo o sinal de hibridação de cada sonda ser registado num detector adequado (Rosário, 2009). Embora possua um potencial elevado para mapear a diversidade total numa amostra, a sua aplicação é limitada relativamente à identificação de microrganismos cuja presença prévia não seja conhecida (Dahllöf, 2002; Wagner *et al.*, 2007).

Outro recente avanço nas técnicas moleculares de ecologia microbiana levou ao aparecimento do método de marcação de isótopos estáveis (SIP). Esta técnica facilita a análise de identificação de microrganismos envolvidos em processos específicos *in situ*. Assim, o SIP baseia-se na marcação de certos tipos de biomarcadores microbianos (dos quais podem ser usados para a identificação microbiana) com isótopos estáveis, geralmente com o ^{13}C , com posterior análise, de modo a se proceder à identificação dos membros da comunidade microbiana activos, que assimilaram a substância de interesse. Além disso, este método também pode ser útil na análise do comportamento dos organismos, em resposta a vários estímulos, fornecendo uma visão prática das funções microbianas fundamentais (Sims, 2007).

Entre os diversos métodos SIP, o SIP associado a um ácido nucleico (DNA ou RNA) é o mais adequado para propósitos taxonómicos, fornecendo uma quantidade elevada de informação.

No entanto, esta técnica ainda não é universalmente aplicável, dado o seu recente aparecimento e o número escasso de estudos que a empregaram (Sims, 2007).

Assim, conclui-se que enquanto os padrões de DGGE/TGGE e de SSCP têm uma maior facilidade na caracterização de bandas distintas, o T-RFLP parece ser o método mais indicado para uma análise de rotina de um elevado número de amostras, dado que este método não se sujeita aos problemas inerentes da variação entre géis, demonstrando ser mais reprodutível e com potencial para automatização (Rosário, 2009). Esta técnica é adequadamente indicada para estudos de comunidades complexas, contendo espécies de reduzida abundância, devido ao facto da sua elevada sensibilidade (cinco vezes superior em relação aos métodos DGGE/TGGE) na detecção de ribótipos em amostras ambientais (Nocker *et al.*, 2007).

A escolha dos métodos de identificação e/ou caracterização microbiana para casos de estudo específicos torna-se uma decisão difícil, pois para além de existir uma extensa gama de opções, não existe uma correspondência directa entre uma técnica e um tipo de amostra. Então essa selecção será dependente do tipo de amostra em questão, dos resultados pretendidos e de outros aspectos.

2. Objectivos

Esta dissertação teve como objectivo contribuir para o estudo de biofilmes no que diz respeito à identificação e caracterização de microrganismos dominantes em biofilmes de diferentes idades.

Para a execução deste trabalho foi utilizada uma instalação piloto de discos biológicos que, através do seu funcionamento em modo contínuo, serviu como meio de suporte para os biofilmes se desenvolverem.

A realização do presente estudo pretende constituir um passo para a optimização de sistemas de biomassa fixa, uma vez que um conhecimento mais aprofundado dos microrganismos que apresentarem uma maior taxa de remoção de substrato da água residual, permitirá aumentar a eficiência de tratamento nas ETAR e, conseqüentemente, a melhoria da qualidade da água tratada.

3. Plano Experimental

De modo a cumprir o objectivo do presente trabalho foi elaborado um Plano Experimental, que incluiu duas fases, sendo este apresentado de seguida (Quadro 3.1).

Quadro 3.1 – Resumo do Plano Experimental

Fase	Objectivo	Descrição sumária
0	Estudos preparatórios necessários para a realização da fase seguinte	- Estudo de um biofilme com espessura (e idade) crescente, utilizando uma concentração de substrato de 500 mg/l - CQO
1	Identificação e caracterização da biomassa presente nos biofilmes	- Estudo dos microrganismos dominantes presentes nos biofilmes desenvolvidos na Fase 0, através da técnica FISH

Nos ensaios correspondentes à Fase 0, a concentração de substrato orgânico utilizada foi de 500 mg O₂/l – CQO. Esta concentração foi escolhida de forma a aproximar as características da solução de alimentação, em termos de CQO, às de uma água residual doméstica de concentração média em termos de matéria orgânica (Maurício, 2009).

O Quadro 3.2 indica os ensaios efectuados relativamente à Fase 0.

Quadro 3.2 – Plano Experimental (Fase 0)

Ensaio	Id (dias)	Caudal (l/h)	S ₀ (mg O ₂ /l)
1	0,5 – 1	0,5	500
2	4 – 5	0,5	500
3	5 – 6	0,5	500

Id – Idade do biofilme; S₀ – Concentração de substrato na alimentação do reactor, medida em CQO.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Substrato

Para a realização deste trabalho foi utilizado leite em pó desnatado (Molico – Nestlé) diluído de modo a se obter uma concentração de 500 mg O₂/l expressa em CQO, sendo este substrato adaptado de Maurício, R. (2009).

No Quadro 4.1 é possível observar-se as principais características da solução de alimentação, correspondente a uma concentração de 500 mg O₂/l - CQO, constatando-se que esta cumpre os requisitos básicos de nutrientes. A relação de CQO/N/P é de 25/1/0,9.

Quadro 4.1 – Principais características do substrato (Fonte: Maurício, 2009)

Parâmetro	Valor
pH	6,7
SST (mg/l)	32
CQO (mg O ₂ /l)	500
Azoto total (mg N /l)	20
Fósforo total (mg P /l)	18

As características apresentadas para a solução de alimentação correspondem a uma diluição de 0,55 g de leite em pó desnatado por litro de água (desmineralizada).

4.1.2. Dispositivos experimentais

4.1.2.1. Para a obtenção de biofilmes

A Figura 4.1 mostra a instalação piloto de discos biológicos montada para a obtenção de biofilmes. Nesta instalação estão incluídos:

a) Sistema de alimentação de substrato e de recolha de efluente, integrando o seguinte equipamento:

- Dois reservatórios de armazenamento da solução de alimentação com uma capacidade individual de 65 litros, sendo cada um instalado num frigorífico de marca “*Sharp*” (Japão), de modo a preservar o substrato;
- Seis bombas peristálticas de débito variável, de marca “*Watson – Marlow*” (Inglaterra), tipos 302S, 502S e 504U;
- Seis reservatórios para a recolha de efluente da instalação piloto com uma capacidade de 25 litros cada.

b) Reactores de discos biológicos, com as seguintes características:

- Número de reactores: 6
- Volume unitário (l): 0,9
- Número de discos por reactor (Teflon): 4
- Diâmetro dos discos (m): 0,12
- Accionamento dos discos através de moto-reductor de marca “*Oriental Motor*” (Japão) 5IK60GS – CFE
- Velocidade de rotação dos discos (r.p.m.): 10

c) Controlo da temperatura do laboratório onde se realizou o trabalho experimental, aproximadamente a 20°C, através de sistema de ar condicionado.

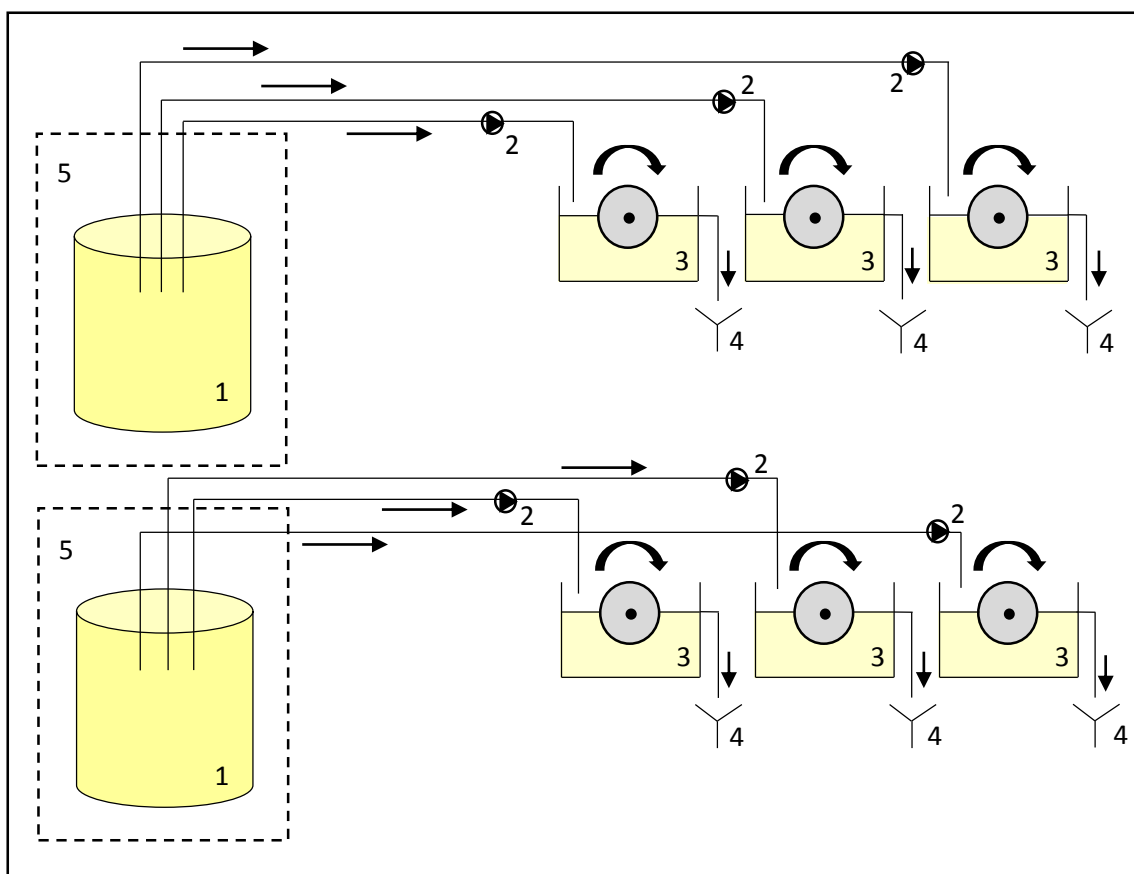


Figura 4.1 – Instalação piloto (1 – Solução de alimentação de substrato; 2 – Bombas peristálticas; 3 – Reactores de discos biológicos; 4 – Descarga de efluente; 5 – Câmara frigorífica a 4°C.)

Na Figura 4.2 mostra-se os diversos sistemas constituintes da instalação piloto.

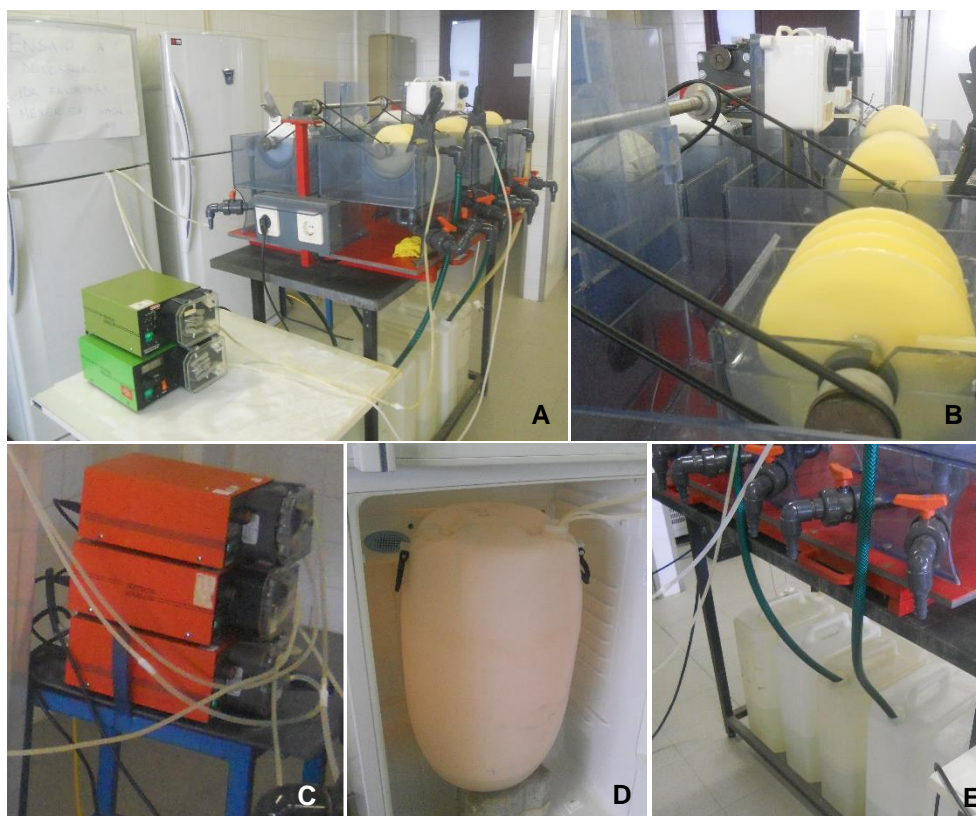


Figura 4.2 – Aspecto da instalação piloto (A – Vista geral; B – Pormenor dos reactores de discos biológicos; C – Bombas peristálticas; D – Sistema de alimentação; E – Sistema de recolha de efluente.)

4.2. Métodos

Tendo por base as técnicas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), todas as determinações analíticas foram realizadas de acordo com as mesmas.

Através da filtração, a fracção solúvel das amostras foi alcançada, utilizando-se filtros “*Whatman*” GF/C (EUA).

4.2.1. Carência Química de Oxigénio (CQO)

A determinação da CQO pelo método de refluxo aberto foi realizada na fracção solúvel das amostras.

A amostra inserida nos tubos do aparelho de refluxo, numa mistura de ácido sulfúrico com sulfato de prata, à qual se adicionou dicromato de potássio em excesso, foi mantida em refluxo a aproximadamente 150°C durante duas horas. Após a digestão, procedeu-se à titulação do excesso de dicromato com a solução de sulfato de ferro (II) e amónio, na presença de uma ou duas gotas da solução indicadora de ferroína. O ponto de viragem foi caracterizado pela observação da mudança brusca de cor azul-esverdeado para castanho-avermelhado.

Em simultâneo, foram efectuados dois ensaios em branco adoptando o mesmo modo operativo, no entanto, a toma de amostra foi substituída por água destilada.

A CQO, expressa em mg/l, foi determinada através da seguinte fórmula:

$$CQO(mgO_2/l) = \frac{8000 \times c \times (V_1 - V_2)}{V_0}$$

Onde:

c – Concentração (mol/l) da solução de sulfato de ferro (II) e amónio;

V_0 – Volume (ml) da toma de amostra para ensaio;

V_1 – Volume (ml) da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido no ensaio em branco;

V_2 – Volume (ml) da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido no ensaio com a amostra;

8000 – Massa molar (mg/l) de $1/2$ de O_2 .

A concentração da solução de sulfato de ferro (II) e amónio (c) é dada pela seguinte fórmula:

$$c(mol/l) = \frac{10,0 \times 0,04 \times 6}{V} = \frac{2,4}{V}$$

Onde V corresponde ao volume, em mililitros, da solução de sulfato de ferro (II) e amónio consumido na titulação.

Na Figura 4.3 apresenta-se o aparelho de refluxo onde a mistura reaccional foi levada à ebulição.



Figura 4.3 – Aparelho de refluxo de marca “G. Vittadini Recod/6”

4.2.2. Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Os SST foram obtidos pela filtração da amostra e secagem do resíduo retido no filtro, tarado a 103-105°C até peso constante. O aumento de peso no filtro é correspondente aos SST presentes no volume de amostra filtrado. Para a determinação dos SSV foi aplicada uma incineração ($500 \pm 50^\circ\text{C}$) do papel de filtro usado na obtenção dos SST. A análise dos SST e SSV foi efectuada utilizando-se filtros de papel “Whatman” GF/C (EUA) de 47 mm de diâmetro.

A Figura 4.4 mostra os equipamentos utilizados para a secagem dos sólidos retidos no filtro, numa primeira fase na estufa e, posteriormente, na mufla.

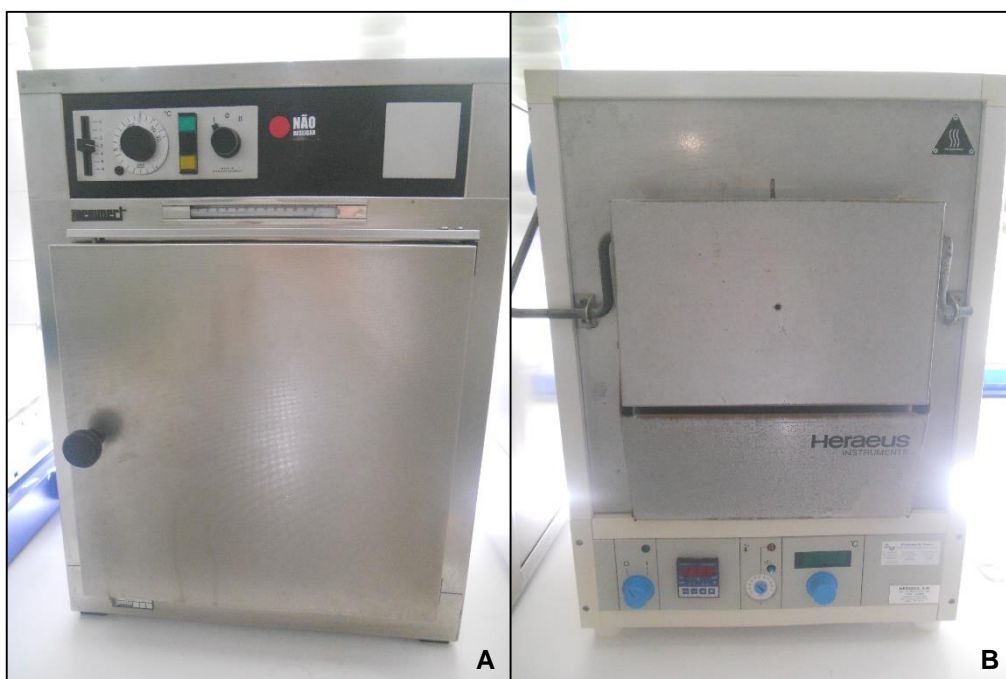


Figura 4.4 – (A) - Estufa de marca “memmert”; (B) - Mufla de marca “Heraeus INSTRUMENTS”

4.2.3. pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, através de um aparelho de marca “Orion” (EUA), modelo SA 720.

4.2.4. Oxigénio Dissolvido

Este parâmetro foi determinado através de um eléctrodo de oxigénio de marca “Orion” (EUA), modelo 97-08.

4.3. Modo Operatório

4.3.1. Procedimento de base

Cada ensaio realizado para a obtenção de biofilmes de espessura controlada pela exploração da instalação piloto, incluiu as seguintes operações:

- Preparação da solução de alimentação pela diluição de leite em pó com água (0,55 g por litro de água), sendo esta introduzida nos reservatórios de armazenamento. Também foi efectuada a verificação e, ou acerto de pH. Esta operação foi executada diariamente e a solução mantida a 4°C;
- Verificação e controlo diário da temperatura dos reservatórios de alimentação e da sala onde decorreram os ensaios;
- Calibração dos débitos das bombas peristálticas, através de proveta graduada e cronómetro. Esta operação foi executada diariamente;
- Recolha de amostras da fase líquida do reactor em ensaio;
- Pré-tratamento e preservação das amostras recolhidas, incluindo filtração, adição de ácido sulfúrico concentrado, até o pH igualar a 4, e conservação em frigorífico a $\approx 4^{\circ}\text{C}$;
- Determinação da CQO, dos SST e dos SSV das amostras recolhidas;
- Determinação diária do pH e do oxigénio dissolvido na fase líquida dos reactores.

O ensaio dava-se por terminado quando, através da determinação da CQO, se atingia o estado próximo do estacionário, correspondente ao período em que se verificava a estabilização dos valores de concentração de substrato da fase líquida (aproximadamente 8 dias).

Após a realização de cada ensaio, procedeu-se à manutenção de todo o material e equipamento, adoptando-se as seguintes operações:

- Lavagem dos tanques de alimentação, por sucessivas passagens por água;
- Limpeza das tubagens com água, de modo a evitar entupimentos através do crescimento de biofilme nas paredes das mesmas;
- Lavagem dos reactores através de sucessivas passagens por água, efectuando-se previamente a raspagem com um escovilhão do biofilme aderido aos discos e paredes do reactor.

4.3.2. Operação dos reactores

Esta fase experimental incluiu três ensaios, correspondentes a três intervalos de idade de biofilme (0,5 a 1 dia, 4 a 5 dias e 5 a 6 dias). Os reactores funcionaram em regime contínuo e a idade do biofilme foi mantida constante no tempo, para cada ensaio.

Para a solução de alimentação dos três ensaios foi utilizada uma concentração aproximadamente constante (500 mg O₂/l, expressa em CQO).

Esta fase serviu para arranque do sistema, para se poder comparar com ensaios anteriormente realizados noutros estudos.

Devido ao facto do biofilme ser considerado uma estrutura frágil, adaptou-se um modo operativo de transferência de conteúdos entre reactores, isto é, transferência do conteúdo do reactor em análise para o reactor com o biofilme de idade desejada. Deste modo, o biofilme mantém-se preservado, uma vez que não se transfere o suporte com o biofilme, mas apenas o conteúdo dos reactores.

Nos diagramas das Figuras 4.5, 4.6 e 4.7 exemplifica-se este modo de funcionamento para obtenção de biofilmes, correspondentes às idades de 0,5 a 1 dia, 4 a 5 dias e 5 a 6 dias.

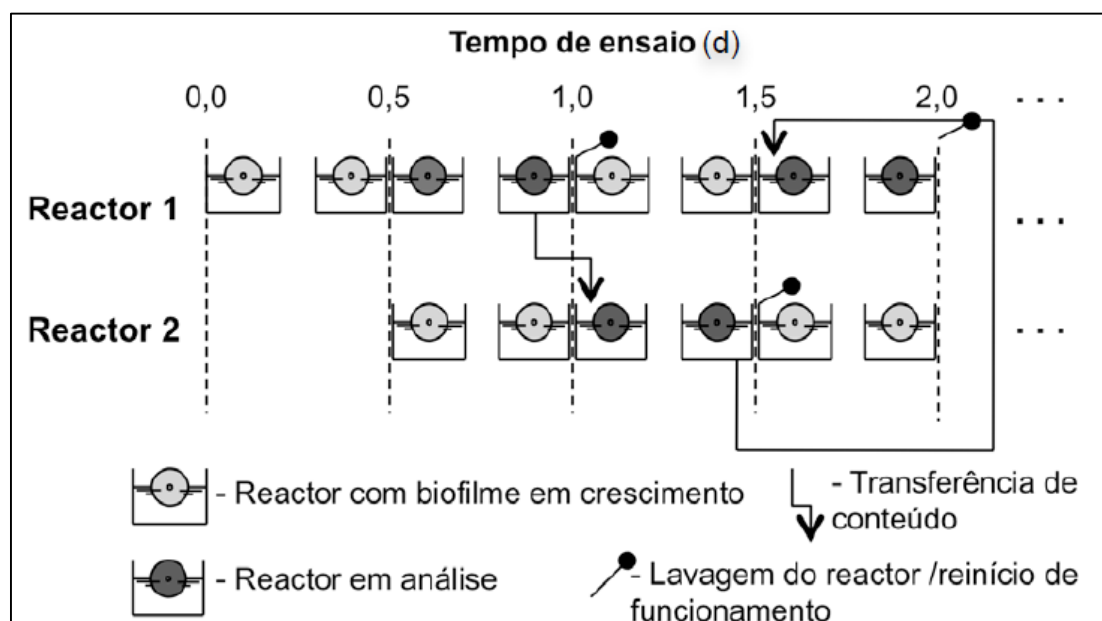


Figura 4.5 – Demonstração do modo operativo para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 0,5 e 1 dia (Fonte: Maurício, 2009)

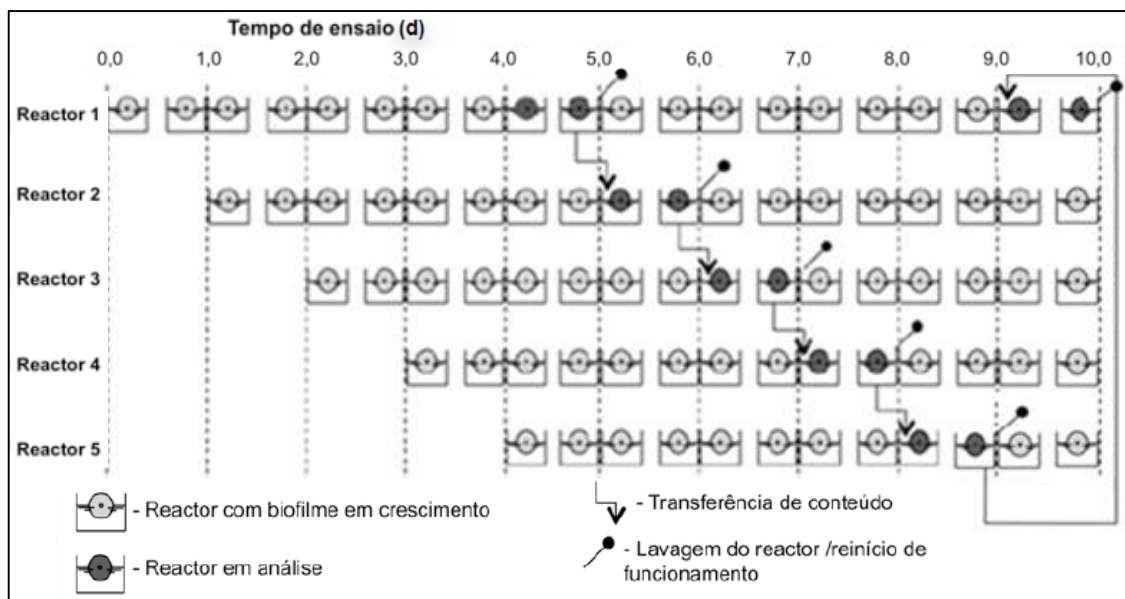


Figura 4.6 – Demonstração do modo operatório para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 4 e 5 dias (Adaptado de Maurício, 2009)

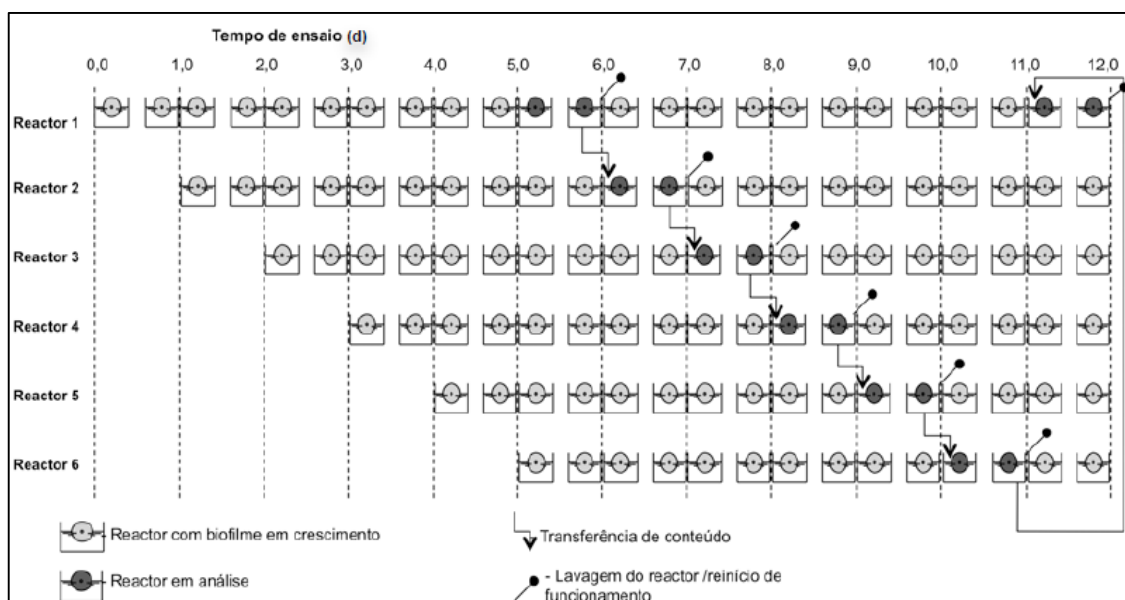


Figura 4.7 – Demonstração do modo operatório para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 5 e 6 dias (Fonte: Maurício, 2009)

4.3.3. Procedimento para a identificação da biomassa presente nos biofilmes

Para cada ensaio, correspondente às diferentes idades de biofilme analisadas, recolheram-se amostras de biofilme com a idade pretendida, para posterior análise através da técnica FISH. As amostras foram recolhidas no final de cada ensaio, após a taxa de degradação de substrato ter atingido a condição de “estado estacionário”, de acordo com os valores do estudo de Maurício (2009). A recolha das amostras foi realizada em duplicado, procedendo-se à raspagem do biofilme pressionando uma espátula contra a superfície dos discos, removendo-se cuidadosamente uma pequena porção.

4.3.3.1. Fixação das amostras

Antes da técnica FISH ser aplicada, teve-se de efectuar a fixação das amostras de biofilme. Deste modo, adoptou-se o seguinte procedimento (Amann, 1995):

- Recolha, para um tubo eppendorf, de um volume de amostra (biofilme do reactor com idade desejada) para três volumes de paraformaldeído fixador;
- Colocação do tubo com o conteúdo homogeneizado num frigorífico a 4°C, entre uma a três horas;
- Centrifugação da amostra (5000 x g) com consequente remoção do sobrenadante;
- Lavagem das células com 1 ml de *Phosphate Buffered Saline* (PBS);
- Centrifugação da amostra e posterior remoção do sobrenadante;
- Adição de 0,5 ml de etanol gelado e 0,5 ml de PBS ao tubo eppendorf;
- Homogeneização do conteúdo do tubo num vortex;
- Armazenamento da amostra num congelador a -20°C.

A Figura 4.8 mostra os equipamentos utilizados neste procedimento experimental.

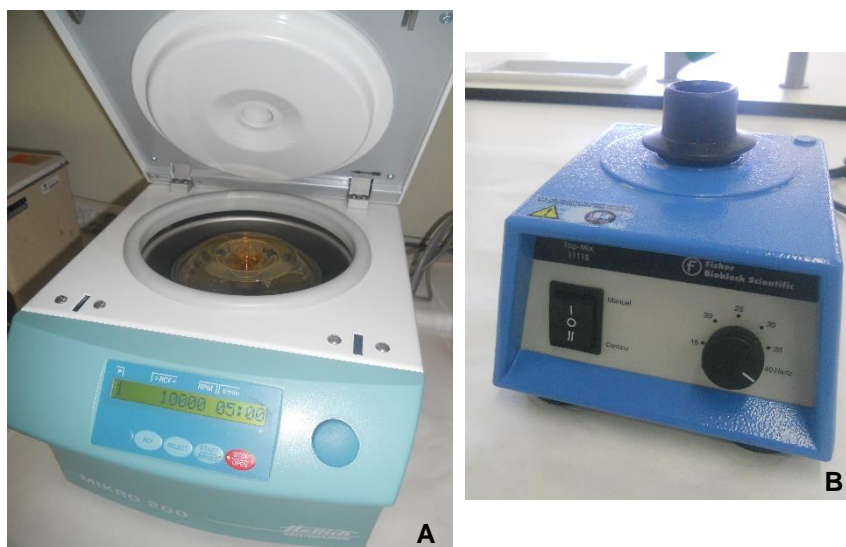


Figura 4.8 – (A) - Centrífuga de marca “Hettich MIKRO 200”; (B) - Vortex de marca “Fisher Bioblock Scientific Top-Mix 11118”

Reagentes

→ **Phosphate Buffered Saline, pH 7.2**

- 30x PBS: adicionar 38,7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 113,1 g de NaCl a 500 ml de água *MilliQ*. Levar à autoclave e armazenar.
- Diluir 1:10 para se obter 3x PBS e levar novamente à autoclave.

→ **4% Paraformaldeído (PFA)**

- Colocar uma balança e uma placa de aquecimento e agitação numa *hotte*.
- Aquecer 65 ml de água purificada a 60°C e pesar 4 g de PFA em pó. Adicionar o PFA à água aquecida, obtendo-se uma solução turva. Adicionar duas gotas de 2 M NaOH, permitindo a dissolução do PFA em 1 ou 2 minutos.
- Arrefecer à temperatura ambiente (retirar a solução da *hotte*) e adicionar 33 ml de 3x PBS.
- Ajustar o pH para 7.2 com 1 M HCl.
- Por forma a remover partículas não dissolvidas, deve-se proceder à filtração através de filtros de 0,2 µm.
- Dividir a solução em volumes aplicáveis e congelar.

4.3.3.2. Técnica FISH

Sondas

Neste procedimento experimental foram utilizadas seis sondas oligonucleotídicas específicas, nomeadamente, ALF969 (Oehmen *et al.*, 2005) para *Alphaproteobacteria*, BET42a e GAM42a (Manz *et al.*, 1992) para *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, respectivamente, HGC69a (Roller *et al.*, 1994) para *Actinobacteria*, LGC354mix (LGC354A, LGC354B e LGC354C) (Meier *et al.*, 1999) para *Firmicutes*, CF319a (Manz *et al.*, 1996) para *Cytophaga-Flavobacteria*, e a sonda geral EUBmix (EUB338, EUB338-II e EUB338-III) (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999) para todas as bactérias. Estas foram as sondas escolhidas dado que permitem a identificação de grupos filogenéticos normalmente encontrados em sistemas de tratamento de águas residuais e em comunidades ambientais (Carvalho *et al.*, 2011).

A técnica FISH compreendeu quatro fases principais, como de seguida se mostra (Amann, 1995):

→ **Aplicação das amostras e desidratação**

1. Identificação dos slides e aplicação das amostras em cada poço (2 µL em cada);
2. Secagem dos slides ao ar;
3. Desidratação numa série de etanol (50%, 80% e 98%), onde cada slide permaneceu três minutos em cada tubo Falcon de 50 ml correspondente a uma solução de etanol (máximo de dois slides por tubo);
4. Secagem dos slides ao ar.

Na Figura 4.9 mostra-se o esquema adoptado na aplicação das amostras de biofilme e das sondas nos três slides utilizados na técnica FISH.

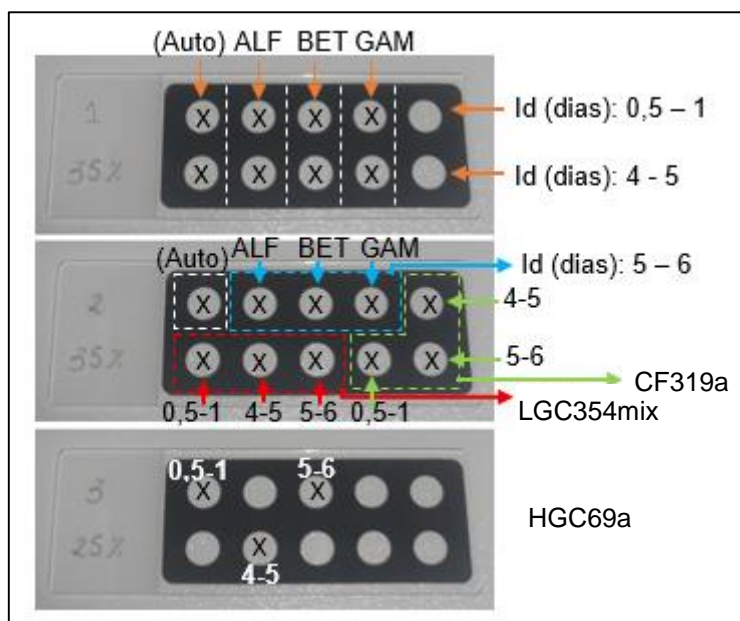


Figura 4.9 – Esquema das amostras e das sondas nos três slides utilizados na análise FISH

Legenda: x – poços do slide onde foram aplicadas as amostras;

Id – idade do biofilme;

(Auto) – Autofluorescência (uma para cada idade de biofilme);

ALF – Sonda ALF969;

BET – Sonda BET42a;

GAM – Sonda GAM42a;

CF319a – Sonda *Cytophaga-Flavobacteria*;

LGC354mix e HGC69a – outras duas sondas.

Na Figura 4.10 mostra-se o método adoptado para a desidratação dos slides numa série de etanol.



Figura 4.10 – Desidratação em três soluções sucessivas de etanol (50%, 80% e 98%)

→ *Hibridação das sondas*

1. Fazer “camas de hibridação”, colocando um pouco de papel dentro de tubos Falcon de 50 ml;
2. Preparação das soluções de hibridação para eppendorfs de 2 ml (concentrações finais – 0.9M NaCl, 0.01% SDS, 20 mM Tris/HCl, pH 7.2) através da junção de 360 µl de NaCl 5M, 40 µl de TRIS-HCl 1M, água *MilliQ* e formamida (ver Quadro 4.2 para se saber estas quantidades para as correspondentes percentagens de formamida utilizadas – 25% e 35%) e 2 µl de SDS 10% na tampa de cada eppendorf. A quantidade de formamida foi adicionada na *hotte*;
3. Aplicação de 8 µl das soluções de hibridação nos poços dos slides, com o cuidado de não tocar com a ponta da pipeta no slide;
4. Inserir o restante conteúdo de cada eppendorf num tubo Falcon com a “cama de hibridação” (tubo de hibridação), de modo a proporcionar a mesma atmosfera de hibridação no tubo;
5. Aplicação de 0,5 µl das sondas nos poços dos slides, misturando cuidadosamente as mesmas com a ponta da pipeta, com o cuidado de não tocar no slide;
6. Colocação do slide na posição horizontal dentro do tubo de hibridação;
7. Incubação dos tubos de hibridação numa estufa a 46°C durante 1,5 a 3 horas.

Quadro 4.2 – Quantidade de formamida e água *MilliQ* necessária para preparar as soluções de hibridação

Quantidade de Formamida (µl)	% Formamida	Quantidade de água <i>MilliQ</i> (µl)
0	0	1598
100	5	1498
200	10	1398
300	15	1298
400	20	1198
500	25	1098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1000	50	598

→ *Lavagem*

1. Preparação das soluções de lavagem em tubos Falcon de 50 ml através da junção de NaCl 5M e EDTA 0.5M (ver Quadro 4.3 para se saber estas quantidades para as correspondentes percentagens de formamida utilizadas – 25% e 35%), 1 ml de TRIS-HCl 1M, 50 µl de SDS 10% e perfazer o volume até 50 ml com água *MilliQ*;
2. Colocação das soluções de lavagem num banho de água para atingirem 48°C antes da lavagem dos slides;
3. Retirar os tubos de hibridação da estufa e proceder-se à lavagem dos slides com a ajuda de uma pipeta de Pasteur;

4. Colocação dos slides nos tubos de lavagem, levando os mesmos ao banho a 48°C entre 10 e 15 minutos;
5. Remoção dos slides do banho e lavagem (à frente e atrás) dos mesmos com água *MilliQ* a 4°C;
6. Secagem rápida dos slides através de ar comprimido, por forma a remover todas as gotas existentes para evitar a dissociação das sondas.

Quadro 4.3 – Quantidade de NaCl e EDTA necessária para preparar as soluções de lavagem

% Formamida	Quantidade de NaCl (μ l)	Quantidade de EDTA (μ l)
0	9000	-
5	6300	-
10	4500	-
15	3180	-
20	2150	500
25	1490	500
30	1020	500
35	700	500
40	460	500
45	300	500
50	180	500

A Figura 4.11 mostra o banho de água a 48°C onde foram inseridas as soluções de lavagem.



Figura 4.11 – Banho de água a 48°C

→ *Montagem dos slides*

1. Aplicação de algumas gotas de Vectashield nos slides;
2. Colocação de uma lamela em cima de cada slide, pressionando cuidadosamente para forçar o Vectashield a cobrir todos os poços;
3. Limpeza do excesso com um pouco de papel;
4. Aplicação de verniz nas extremidades da lamela para evitar o movimento da mesma no slide e para prevenir que o óleo de imersão entre em contacto com o Vectashield;
5. Armazenamento dos slides num congelador a -20°C, protegidos da luz.

Por fim, procedeu-se à observação microscópica dos slides, através de um microscópio de epifluorescência “*Olympus BX51*”, equipado com objectivas de 40x e 100x, e com filtros de fluorescência apropriados para os fluorocromos FitC e Cy3. Associado ao microscópio existe um sistema digital para análise de imagens (software cell ^F).

Na Figura 4.12 mostra-se o microscópio e a lâmpada de fluorescência utilizados para a obtenção das micrografias resultantes da técnica FISH.

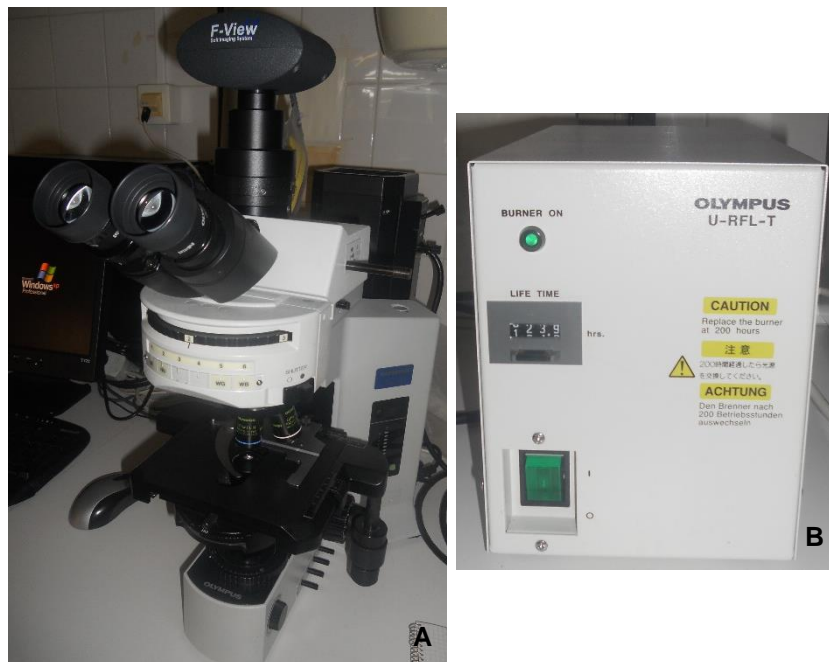


Figura 4.12 – (A) - Microscópio “*Olympus BX51*”; (B) - Lâmpada de fluorescência de marca “*Olympus U-RFL-T*”

5. Resultados e Discussão

5.1. Resultados da Fase 0

Os métodos realizados para controlo dos reactores foram baseados em Maurício (2009). Assim, de acordo com os valores do estudo de Maurício (2009), em cada ensaio foi atingida a situação de eficiência próxima do regime estacionário, correspondente ao período em que se verificava a estabilização dos valores de concentração de substrato da fase líquida.

As idades de biofilme adoptadas nos ensaios realizados para obtenção de biofilmes foram baseadas no estudo de Maurício (2009), pois foram consideradas como as mais favoráveis para a remoção de substrato. Assim, adoptaram-se idades de biofilme de 0,5 - 1 dia, 4 - 5 dias e 5 - 6 dias. Deste modo, nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 mostram-se imagens obtidas do crescimento dos biofilmes para cada ensaio experimental correspondente a cada idade de biofilme estudada, para uma concentração de substrato de 500 mg/l, expressa em CQO.

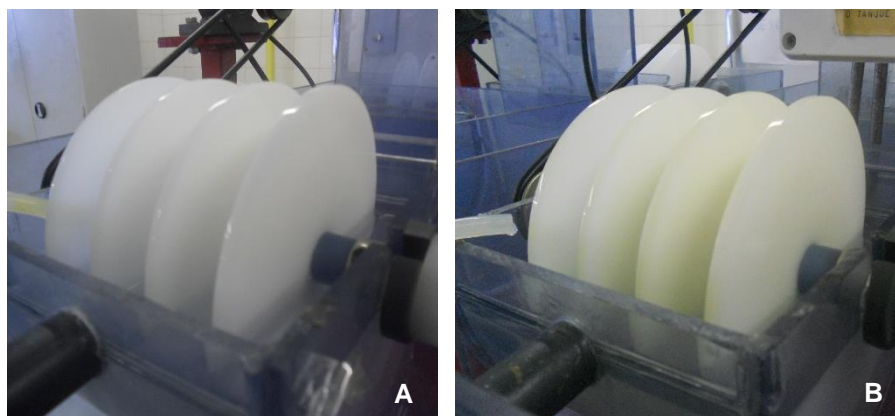


Figura 5.1 – Crescimento de biofilme nos discos no Ensaio 1 (A - 0,5 dia; B - 1 dia)

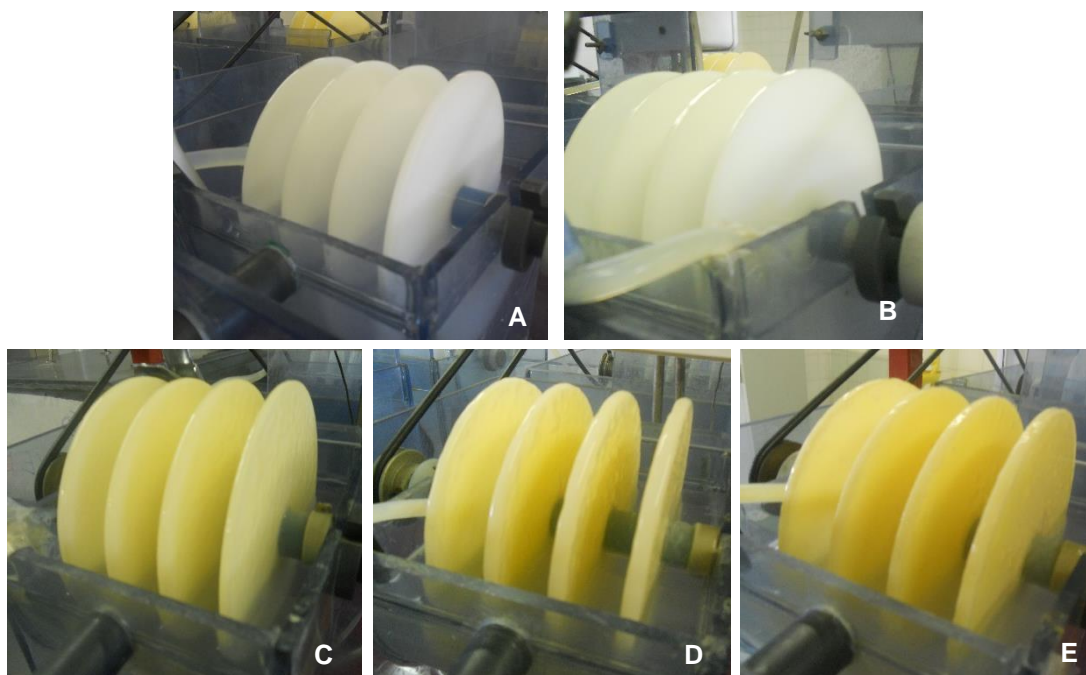


Figura 5.2 – Crescimento de biofilme nos discos no Ensaio 2 (A - 1 dia; B - 2 dias; C - 3 dias; D - 4 dias; E - 5 dias)

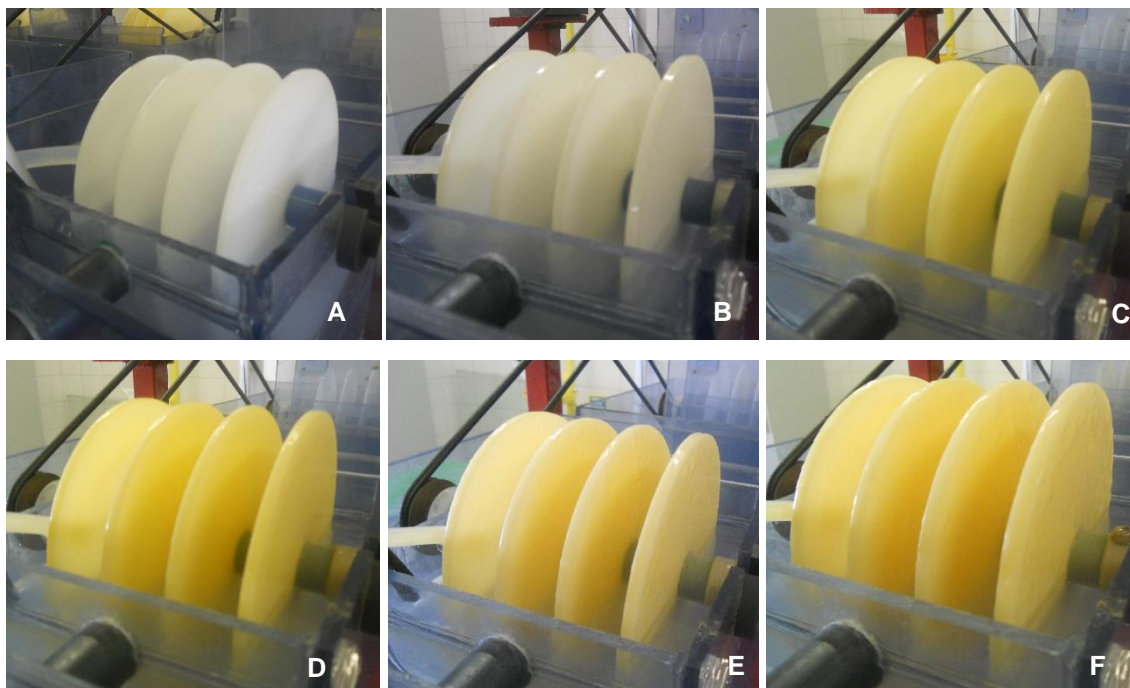


Figura 5.3 – Crescimento de biofilme nos discos no Ensaio 3 (A - 1 dia; B - 2 dias; C - 3 dias; D - 4 dias; E - 5 dias; F - 6 dias)

As figuras mostram a alteração de cor dos biofilmes fixos aos discos à medida que a sua idade aumenta, apresentando uma cor amarelada. Também é notório o facto do aumento de espessura dos biofilmes com o aumento da sua idade, correspondente ao seu crescimento.

5.2. Resultados da Fase 1

A recolha das amostras de biofilmes para cada ensaio permitiu a posterior análise das mesmas através da técnica FISH. Associada a esta técnica, produziram-se imagens através de microscopia, neste caso microscopia de epifluorescência, com o auxílio de um software para análise de imagens.

Assim, as Figuras 5.4 a 5.8 que se apresentam de seguida foram obtidas pela aplicação da técnica FISH às amostras de biofilmes correspondentes às idades estudadas, mostrando o aspecto dos biofilmes consoante a sonda aplicada.

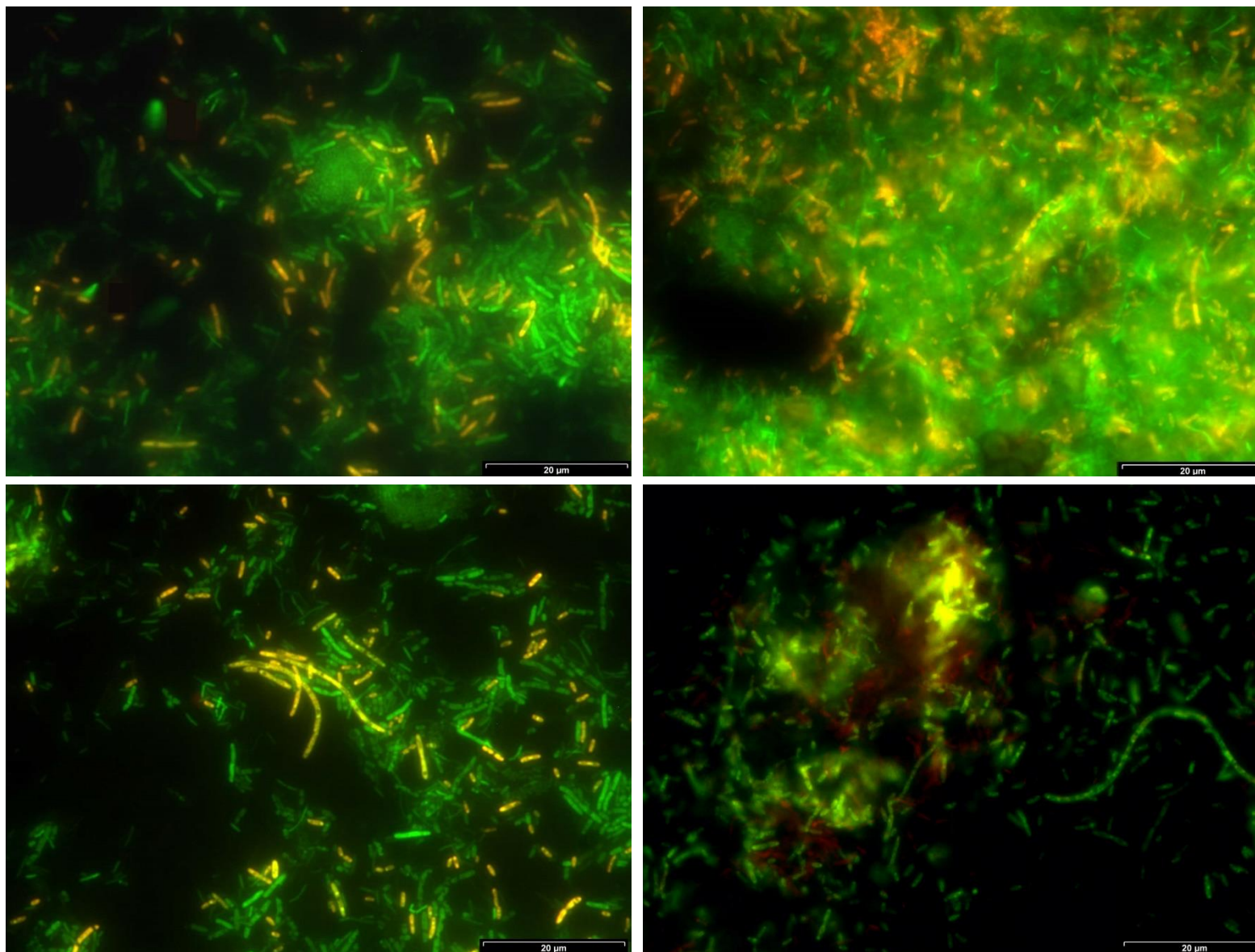


Figura 5.4 - Aspecto do biofilme com Id de 0,5 a 1 dia, para a sonda BET42a (Escala: 20 µm)

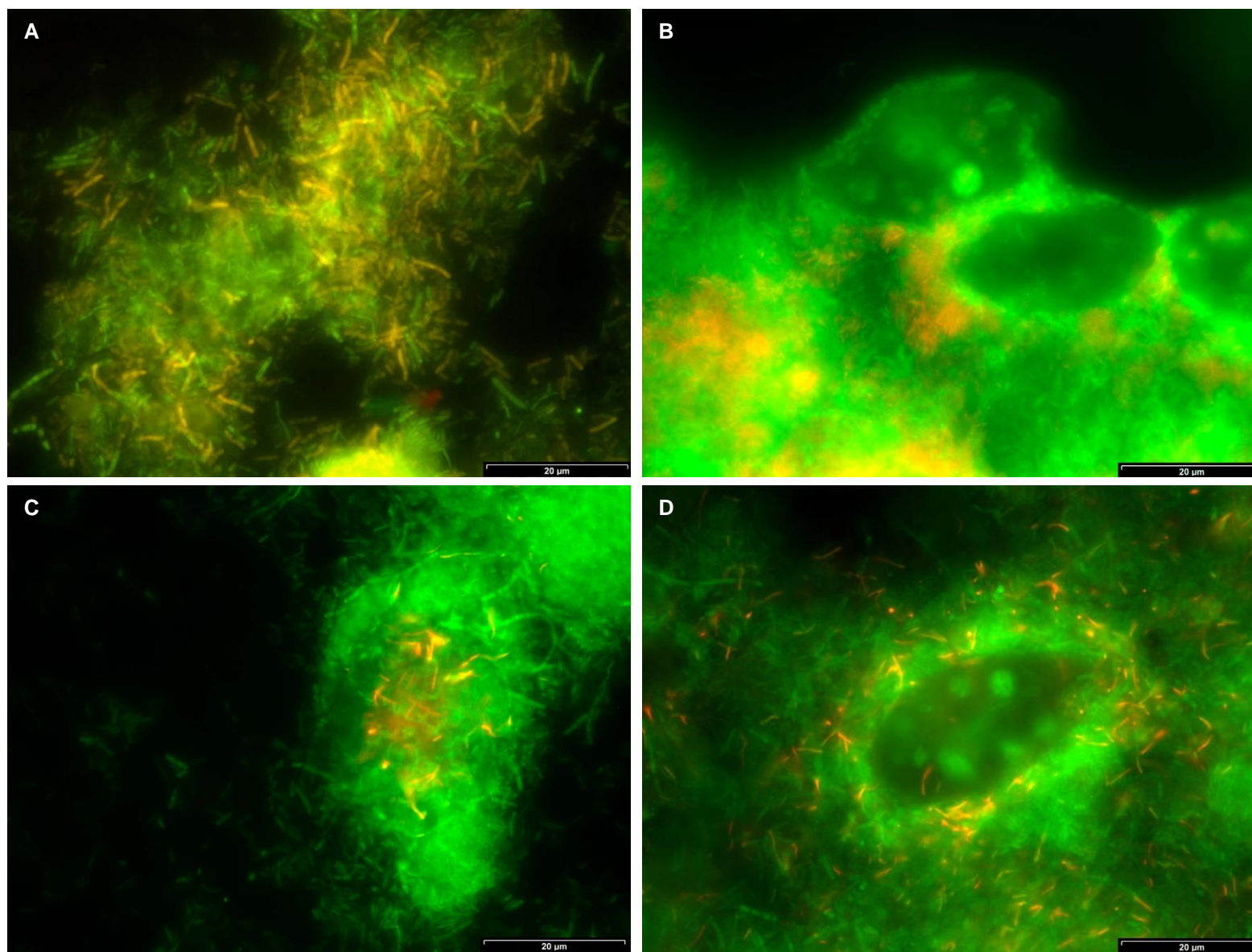


Figura 5.5 – Aspecto do biofilme com Id de 0,5 a 1 dia, para a sonda GAM42a (A), CF319a (B) e HGC69a (C e D) (Escala: 20 µm)

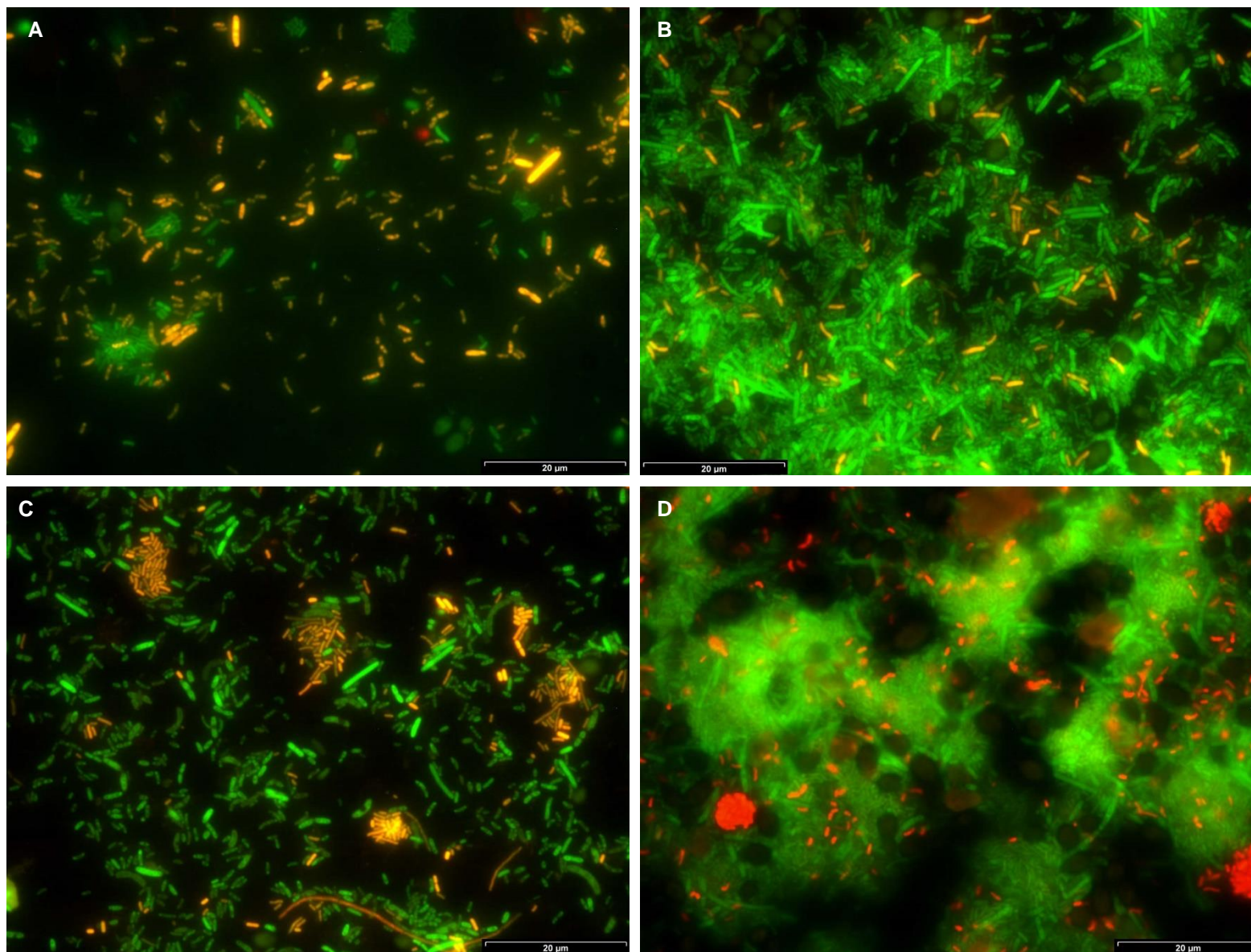


Figura 5.6 – Aspecto do biofilme com Id de 4 a 5 dias, para a sonda BET42a (A), GAM42a (B), CF319a (C) e HGC69a (D) (Escala: 20 µm)

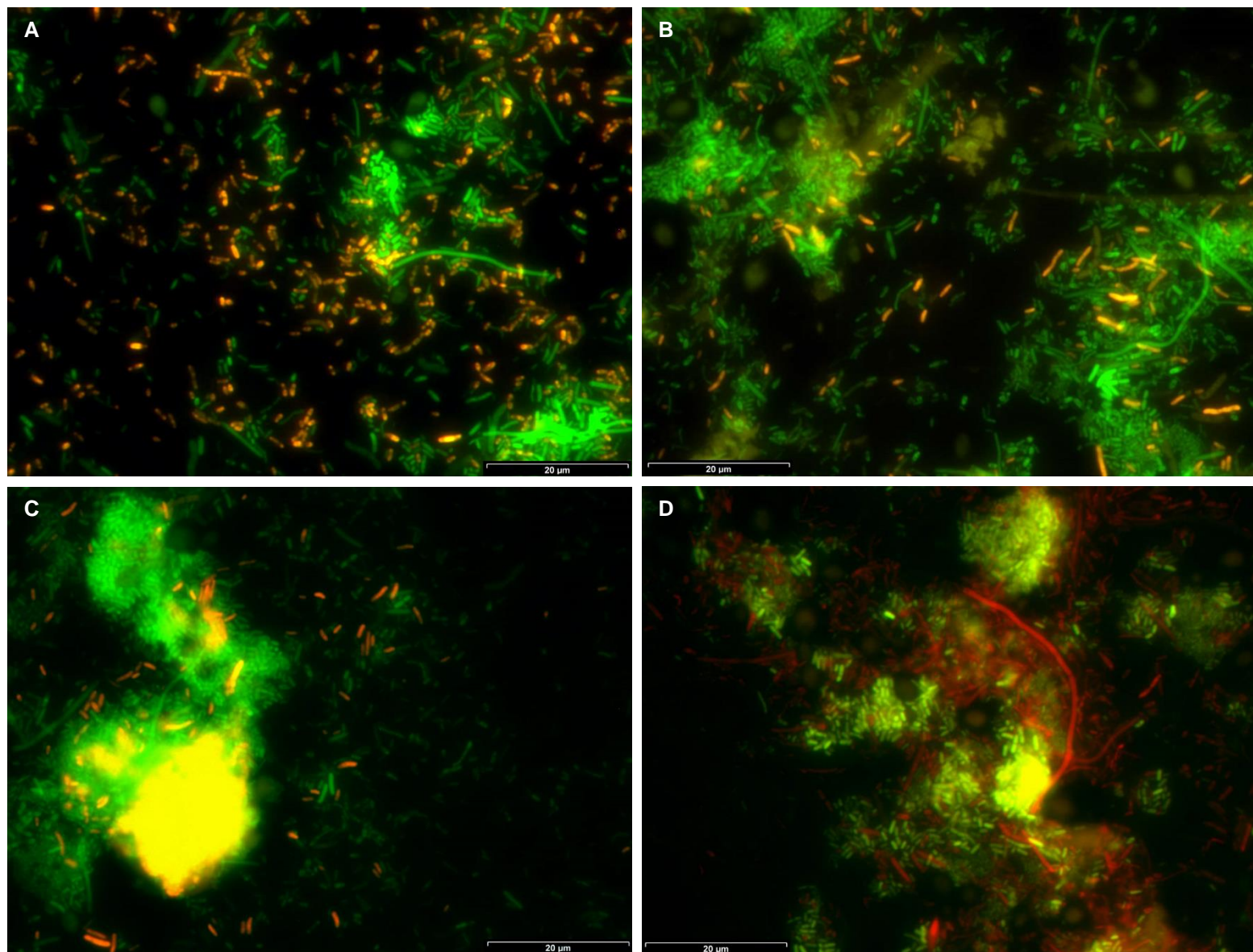


Figura 5.7 – Aspecto do biofilme com Id de 5 a 6 dias, para a sonda BET42a (A), GAM42a (B e C) e CF319a (D) (Escala: 20 µm)

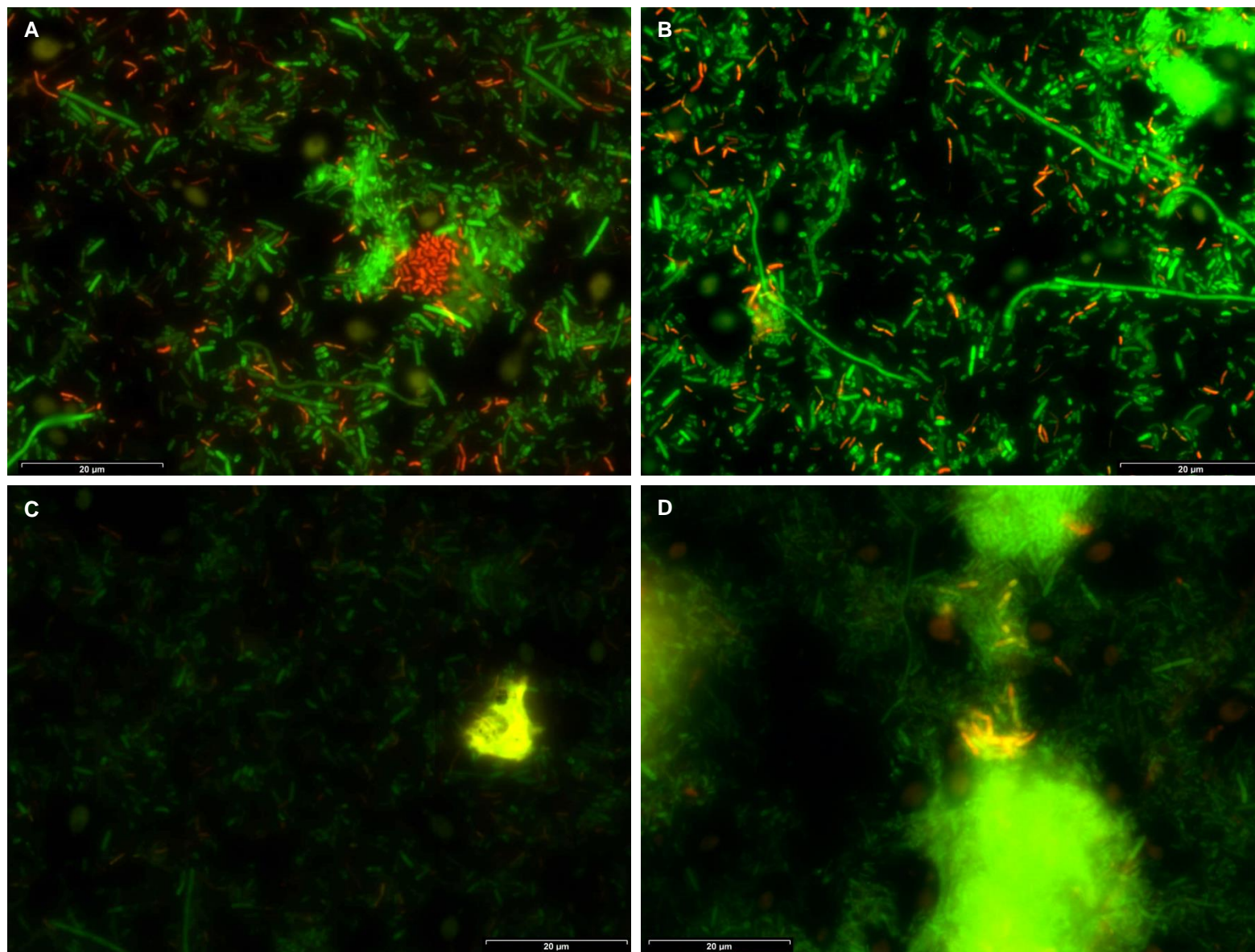


Figura 5.8 – Aspecto do biofilme com Id de 5 a 6 dias, para a sonda HGC69a (A, B e C) e LGC354mix (D) (Escala: 20 µm)

Todas as imagens das Figuras 5.4 à 5.8 apresentam uma cor verde que é correspondente à sonda EUBmix, sendo esta considerada como uma sonda geral para identificar todas as bactérias. A cor amarela ou alaranjada que é apresentada nas referidas figuras é o sinal positivo relativo à presença das bactérias da sonda específica que foi aplicada na técnica FISH. Esta cor amarela é obtida pela sobreposição de um sinal positivo do fluorocromo FitC (emissão a verde), usado na EUBmix, e do fluorocromo Cy3 (emissão a vermelho), usado na sonda específica, como se pode observar na Figura 5.9.

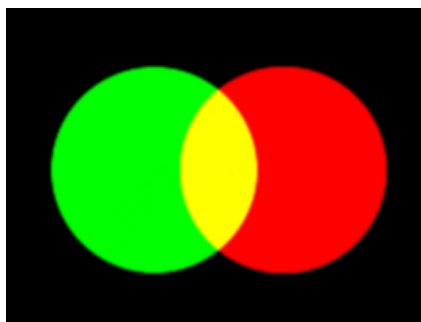


Figura 5.9 – Ilustração da obtenção da cor amarela

Assim, através dos resultados obtidos verificou-se a ausência de sinal por parte das bactérias gram-negativas pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* do filo *Proteobacteria*, correspondentes à sonda ALF969, em todas as idades de biofilme analisadas.

A Figura 5.4 apresenta imagens típicas do biofilme de idade de 0,5 a 1 dia, correspondentes à sonda BET42a que identifica bactérias gram-negativas pertencentes à classe *Betaproteobacteria* do filo *Proteobacteria*. Pela análise dos resultados de hibridação com a sonda BET42a constatou-se a presença de bactérias com diversas morfologias, nomeadamente, bastonetes compridos, cocobacilos e filamentosas. As filamentosas eram de dois tipos, umas longas, finas e segmentadas e outras curtas. A Figura 5.5 mostra o aspecto do biofilme com idade de 0,5 a 1 dia, sendo a Figura 5.5 (A) relativa à sonda GAM42a que identifica bactérias gram-negativas pertencentes à classe *Gammaproteobacteria* do filo *Proteobacteria*. Estas bactérias demonstraram uma morfologia semelhante a bactérias filamentosas curtas. Também foi possível observar-se bactérias com morfologia de bastonete, mas em menor quantidade relativamente às *Betaproteobacteria*. As bactérias gram-negativas *Cytophaga-Flavobacteria* do filo *Bacteroidetes*, correspondentes à sonda CF319a (Figura 5.5 (B)), apresentaram-se em pequenos *clusters* embebidos em flocos. As imagens (C) e (D) da Figura 5.5 correspondem à sonda HGC69a, que identifica bactérias gram-positivas com elevado conteúdo GC (*Actinobacteria*). Nestas imagens foi possível verificar-se a existência de bactérias filamentosas curtas e finas.

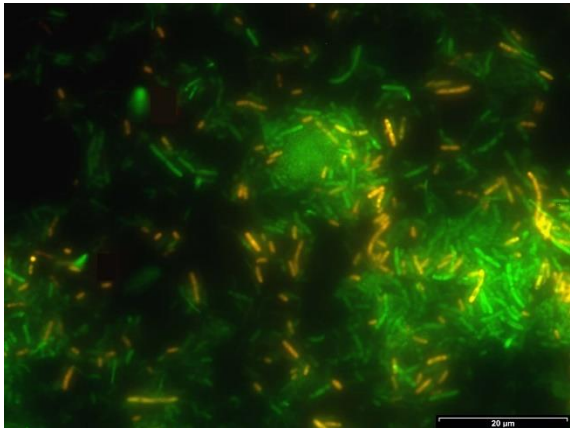
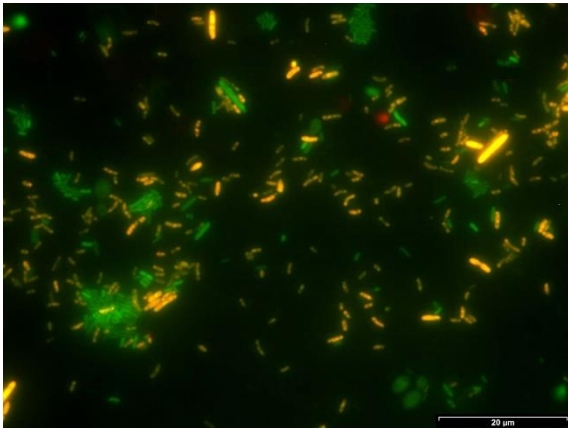
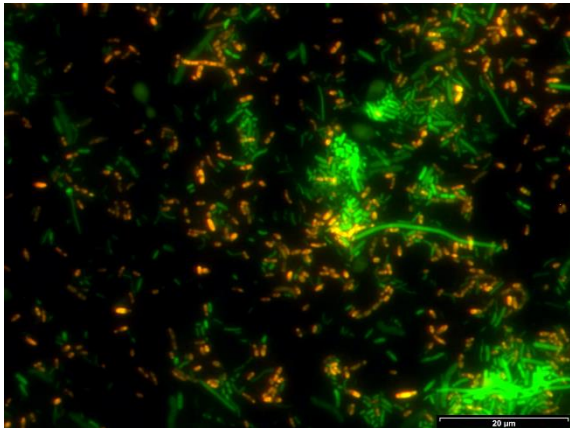
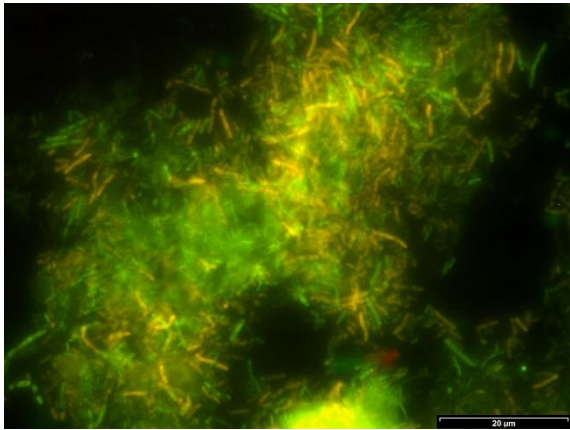
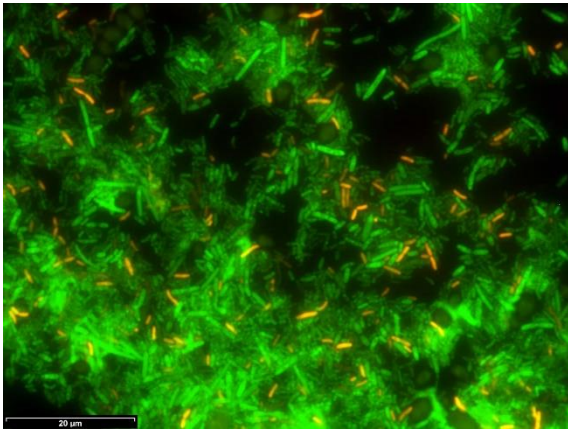
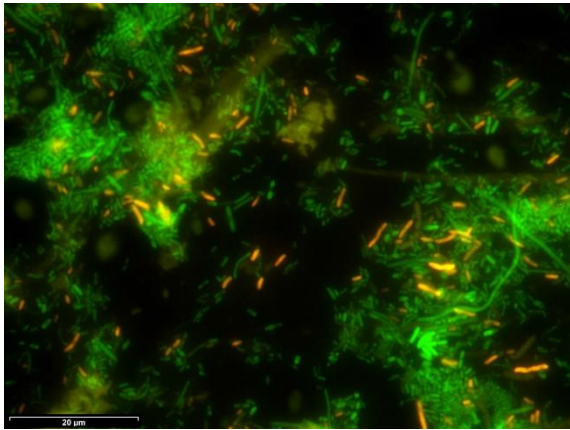
Relativamente à idade de biofilme de 4 a 5 dias, correspondente à Figura 5.6, na imagem (A) com a sonda BET42a pôde verificar-se morfologias de bactérias muito semelhantes, tais como bastonetes e filamentosas curtas e espessas. Também se observou filamentosas segmentadas e ramificadas. A imagem (B) corresponde à sonda GAM42a, onde se observou uma maior diversidade de morfologias de bactérias, particularmente, cocos (quantidade reduzida), filamentosas segmentadas e curtas, e bastonetes (quantidade elevada), apresentando-se diversos tipos, nomeadamente tipos alongado, curvilíneo e recto. A morfologia apresentada pelas bactérias com a sonda CF319a (Figura 5.6 (C)) foi bastante diversa, exibindo pequenos aglomerados de bastonetes, algumas filamentosas dispersas, tanto compridas como curtas, alguns cocos e cocobacilos dispersos. Na imagem (D) relativa à sonda HGC69a pôde observar-se bactérias com morfologias semelhantes, nomeadamente bastonetes curtos e filamentosas curtas e espessas, estando estas bactérias em pequenos aglomerados ou dispersas. Também se pôde verificar a presença de cocos, mas em quantidade reduzida.

No biofilme com uma idade de 5 a 6 dias utilizando a sonda BET42a (Figura 5.7 (A)) foi possível identificar-se bactérias filamentosas segmentadas, ramificadas e não ramificadas, bastonetes isolados, cocobacilos e ainda alguns cocos. As imagens (B) e (C) da Figura 5.7 correspondem às observações efectuadas para a sonda GAM42a, para a idade de biofilme de 5 a 6 dias, demonstrando morfologias semelhantes de bactérias como bastonetes longos e curvilíneos e outros curtos, formando aglomerados, por vezes já com uma dimensão significativa. Também se pôde verificar a presença de bactérias filamentosas curtas, não segmentadas nem ramificadas, relativamente finas que formavam igualmente aglomerados. Na Figura 5.7 (D) relativa à utilização da sonda CF319a, pôde constatar-se que o biofilme era constituído principalmente por bactérias em forma de bastonetes curtos em aglomerados e por poucas bactérias filamentosas curtas e não segmentadas. As imagens (A), (B) e (C) da Figura 5.8 mostram uma das visualizações do biofilme, com idade de 5 a 6 dias, com a sonda HGC69a. Este biofilme apresentava bastonetes curtos dispersos e em aglomerados. Também se observaram bactérias filamentosas curtas e finas e alguns cocos. Observou-se ainda, um biofilme caracterizado por um aglomerado de filamentosas, conforme se mostra na imagem (C) da referida Figura.

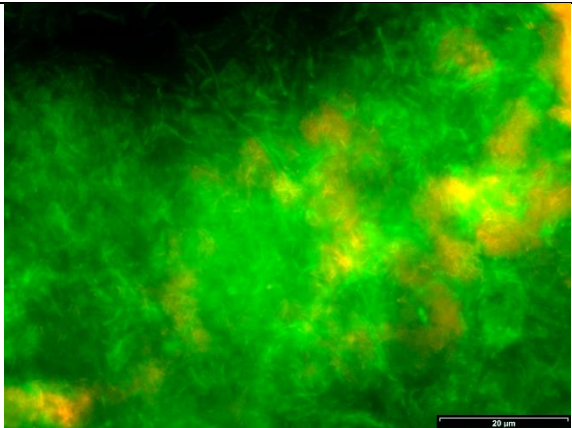
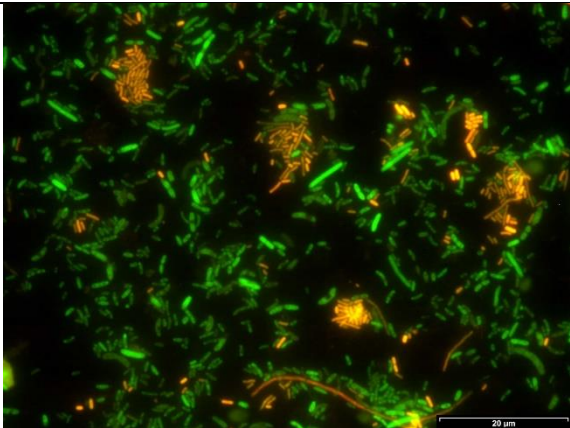
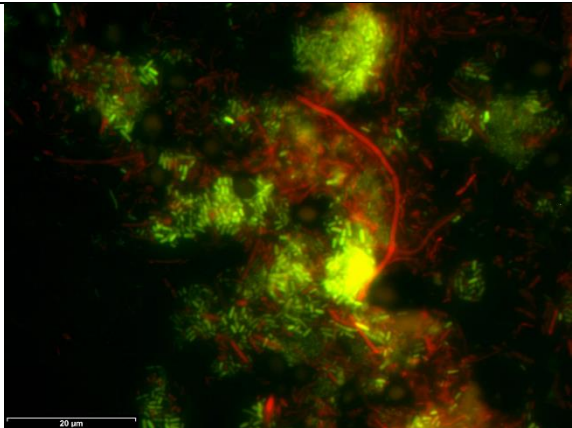
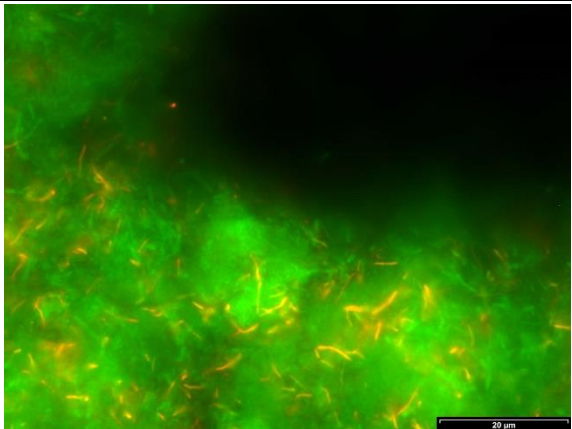
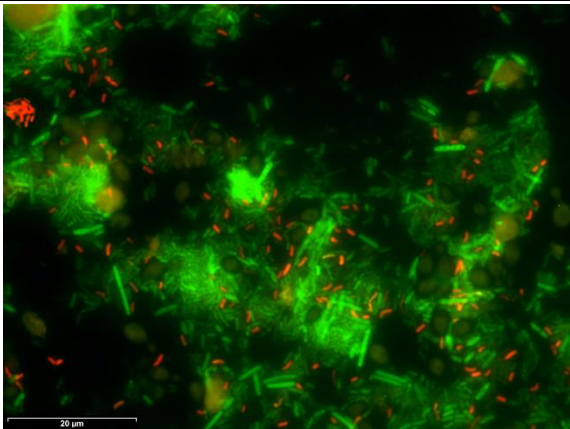
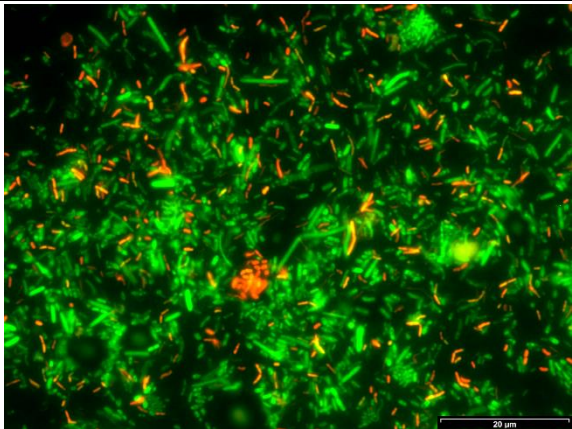
Em relação à utilização da sonda LGC354mix usada para a identificação de bactérias gram-positivas com baixo conteúdo GC (*Firmicutes*), não se obteve sinal para as idades de biofilme mais baixas, isto é, para biofilmes com idade de 0,5 a 1 dia e 4 a 5 dias. No entanto, para a idade de biofilme de 5 a 6 dias (Figura 5.8 (D)) verificou-se a presença, embora reduzida, de bactérias de morfologia filamentosa.

O Quadro 5.1 apresenta um resumo dos resultados obtidos da técnica FISH, com uma imagem típica para cada situação, onde é possível fazer-se uma comparação entre as diferentes idades dos biofilmes.

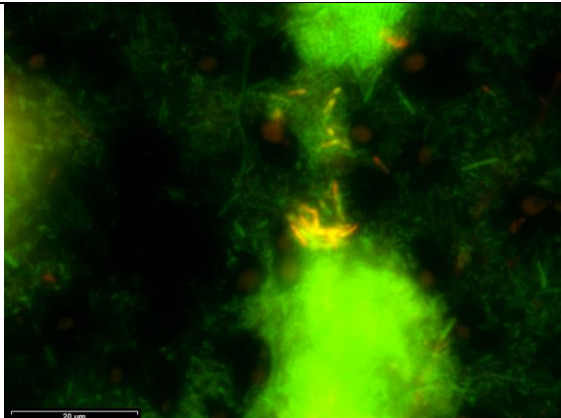
Quadro 5.1 – Quadro resumo (Escala: 20 µm)

		IDADE DO BIOFILME		
		0,5 – 1 dia	4 – 5 dias	5 – 6 dias
SONDAS	ALF969	(Sem sinal)	(Sem sinal)	(Sem sinal)
	BET42a			
	GAM42a			

Quadro 5.1 – Quadro resumo (Escala: 20 µm) (cont.)

		IDADE DO BIOFILME		
		0,5 – 1 dia	4 – 5 dias	5 – 6 dias
SONDAS	CF319a			
	HGC69a			

Quadro 5.1 – Quadro resumo (Escala: 20 µm) (cont.)

		IDADE DO BIOFILME		
		0,5 – 1 dia	4 – 5 dias	5 – 6 dias
SONDAS	LGC354mix	(Sem sinal)	(Sem sinal)	

O Quadro 5.2 apresenta uma análise semi-quantitativa dos resultados obtidos após a técnica FISH, apresentando uma comparação relativa entre as idades de biofilme estudadas para as diferentes sondas aplicadas na técnica.

Quadro 5.2 – Análise semi-quantitativa dos resultados da técnica FISH

SONDAS	IDADE DO BIOFILME		
	0,5 – 1 dia	4 – 5 dias	5 – 6 dias
ALF969	-	-	-
BET42a	+	++	+++
GAM42a	+++	+	++
CF319a	+	++	+++
HGC69a	+	++	++
LGC354mix	-	-	+

(-) não detectado; (+) baixa abundância; (++) abundância média; (+++) elevada abundância.

A análise dos Quadros 5.1 e 5.2 tem como intuito a comparação relativa entre as idades de biofilme estudadas em termos de dominância de bactérias, correspondente a cada sonda aplicada na técnica FISH. No Quadro 5.2 é apresentada uma análise comparativa, mas em termos semi-quantitativos da abundância de bactérias associada a cada sonda para cada idade de biofilme analisada. Assim, através destes dados foi possível afirmar que as bactérias da classe *Betaproteobacteria* encontravam-se em elevada abundância para qualquer uma das idades. No entanto, a idade de 0,5 a 1 dia apresentou uma abundância mais reduzida comparativamente com as outras duas idades. As bactérias da classe *Gammaproteobacteria* para a idade de 0,5 a 1 dia demonstraram uma abundância elevada em comparação com a idade de 4 a 5 dias e a de 5 a 6 dias. A relação contrária verificou-se para as bactérias *Cytophaga-Flavobacteria*, isto é, o biofilme de idade de 0,5 a 1 dia apresentou menor abundância destas bactérias em relação às outras idades. A mesma situação se observou para as bactérias *Actinobacteria*, onde as idades mais elevadas (4 – 5 dias e 5 – 6 dias) apresentaram maior abundância relativamente à idade mais baixa (0,5 – 1 dia). As bactérias *Firmicutes* apenas surgiram para a idade de 5 a 6 dias, demonstrando uma abundância reduzida.

Deste modo, pôde constatar-se que, neste estudo, o biofilme de idade de 0,5 a 1 dia era constituído maioritariamente por bactérias *Gammaproteobacteria*. Em relação à idade de 4 a 5 dias, o biofilme apresentou principalmente bactérias *Betaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* e *Actinobacteria*. Enquanto o biofilme de idade de 5 a 6 dias apresentou na sua constituição bactérias *Betaproteobacteria* e *Cytophaga-Flavobacteria*, essencialmente.

Numa observação geral dos slides, também se pôde verificar que, nos biofilmes com idades de 4 – 5 dias e 5 – 6 dias existiam mais semelhanças e características similares, quando comparados com a idade de biofilme de 0,5 – 1 dia. Para além disso, a idade de biofilme menor (0,5 – 1 dia) pareceu apresentar uma abundância inferior de tipos de bactérias, comparativamente às restantes idades, não sendo expectável a existência de fenómenos de competição e, ou predação e, consequentemente de processos inibitórios entre as bactérias nesta idade.

Segundo Pompermayer e Gaylarde (2000), os microrganismos gram-negativos demonstram uma capacidade superior para formação de biofilmes em relação aos gram-positivos. Os resultados obtidos confirmam este facto, dado que bactérias gram-positivas como as *Firmicutes* apareceram apenas numa idade de biofilme estudada e em reduzida abundância, enquanto as bactérias gram-negativas relativas às sondas aplicadas dominaram para todas as idades de biofilme.

A morfologia de células em forma oval que não hibridaram com nenhuma das sondas FISH (inclusivamente a EUBmix), e que se observou em maior abundância nas idades de biofilme superiores, ou seja, 4 a 5 dias e 5 a 6 dias, indica possivelmente, que pela dimensão que apresentam e dada a sua forma, a presença de fungos não filamentosos (leveduras). Como as leveduras requerem um tempo de residência superior às bactérias, pode ser credível o facto da sua existência nestas idades, como já referido anteriormente através do estudo de Cabije *et al.* (2009) que também se verificou a sua presença em sistemas de tratamento por discos biológicos.

A presença de bactérias filamentosas também foi visível nos biofilmes analisados, estando estes resultados de acordo com o estudo de Martín-Cereceda *et al.* (2001 (a)).

6. Conclusões

O presente trabalho permitiu contribuir para o estudo de biofilmes de diferentes idades (0,5 – 1 dia, 4 – 5 dias, 5 – 6 dias), possibilitando uma identificação e caracterização dos microrganismos dominantes nos biofilmes para as referidas idades, através da técnica FISH.

Através dos resultados obtidos, observou-se uma diferenciação clara dos perfis microbianos para as diferentes idades de biofilme analisadas, o que era expectável dado que se seleccionam microrganismos com velocidades de crescimento diferentes consoante o tempo de residência. Como esta é uma característica intrínseca das bactérias, é normal que os microrganismos dominantes para cada idade de biofilme sejam distintos. Assim, pôde concluir-se que para a idade de biofilme menor (0,5 a 1 dia) as bactérias presentes em maior abundância foram as *Gammaproteobacteria*, no entanto, para esta idade, a abundância de tipos de bactérias foi considerada, no geral, inferior relativamente às restantes idades. Também se constatou que o biofilme com uma idade de 4 a 5 dias era constituído principalmente por bactérias *Betaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* e *Actinobacteria*, e o biofilme com uma idade de 5 a 6 dias era constituído essencialmente por bactérias *Betaproteobacteria* e *Cytophaga-Flavobacteria*. Ainda que de uma forma geral, e como já era esperado, as bactérias dominantes nestes biofilmes eram gram-negativas.

Como demonstrado no estudo de Maurício (2009), diferentes idades de biofilme estão associadas a diferentes eficiências de remoção de substrato. Este facto deve-se à diferente selecção microbiana observada nos biofilmes, verificada no presente trabalho.

A presença de leveduras nos biofilmes analisados era expectável, no entanto, este facto não pôde ser confirmado dado que não foram utilizadas sondas específicas para a sua identificação aquando da técnica FISH. No entanto, várias imagens parecem demonstrar a sua presença.

A operação de sistemas de tratamento de águas residuais por biomassa fixa com idade controlada e com um conhecimento aprofundado dos microrganismos presentes nesses biofilmes com elevadas taxas de remoção de substrato, torna-se vantajosa para otimizar o processo de tratamento em ETAR. Consequentemente, também se tornaria benéfico ao nível da qualidade do efluente tratado, pois caso se adoptasse este modo operativo relativo ao controlo da idade de biofilme, poder-se-ia favorecer a etapa final de separação sólido-líquido, segundo Maurício (2009).

6.1. Perspectivas de trabalho futuro

Em relação ao trabalho futuro, existem diversas perspectivas de continuidade que podem ser adoptadas por forma a desenvolver-se novos conhecimentos neste âmbito.

Em primeira instância, seria interessante prosseguir o estudo para uma faixa mais ampla de idades de biofilme e para outras concentrações de substrato. De modo a se poder confirmar as tendências observadas.

Um aspecto importante seria na identificação e caracterização dos microrganismos presentes nos biofilmes, através da adopção de sondas oligonucleotídicas mais específicas com o objectivo de identificar bactérias ao nível da espécie. Para além disso, a identificação também se podia estender para além das bactérias, possibilitando a identificação de outros microrganismos presentes nestes ambientes. Por outro lado, outros métodos de identificação, alguns mais avançados, poderiam ser utilizados para serem comparados os resultados e dessa forma haver uma intercalibração de métodos.

Seria ainda vantajoso e complementar o estudo mais aprofundado dos microrganismos identificados, para uma melhor percepção de fenómenos de interacção entre eles (*quorum sensing*), por forma a detectar outras características dos biofilmes.

7. Bibliografia

- Albuquerque, A. J. C. (2003). Contribuição para o estudo da remoção de residuais de carbono em filtros biológicos de leito imerso e fluxo descendente (Tese de Doutorado). Universidade da Beira Interior.
- Allison, D. G. (2003). The Biofilm Matrix. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. Vol. 19 (2), pp 139 – 150.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 56 (6), pp 1919 – 1925.
- Amann, R. I. (1995). In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Akkermans, A. D. L., van Elsas, J. D., de Bruijn, F. J. (eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp 1 – 15.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*. Vol. 59 (1), pp 143 – 169.
- Andersson, S., Rajarao, G. K., Land, C. J., Dalhammar, G. (2008). Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 283, pp 83 – 90.
- Andersson, S., Dalhammar, G., Rajarao, G. K. (2011). Influence of microbial interactions and EPS/polysaccharide composition on nutrient removal activity in biofilms formed by strains found in wastewater treatment systems. *Microbiological Research*. Vol. 166, pp 449 – 457.
- Ashby, M. N., Rine, J., Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Dimster-Denk, D. (2007). Serial Analysis of rRNA Genes and the Unexpected Dominance of Rare Members of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73 (14), pp 4532 – 4542.
- Banks, M. K., Bryers, J. D. (1991). Bacterial Species Dominance within a Binary Culture Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 57 (7), pp 1974 – 1979.
- Berland, J.-M., Cooper, P. (2001). Processos extensivos de tratamento das águas residuais (Guia). Comissão Europeia. Versão portuguesa.
- Bernhard, J. M., Bowser, S. S. (1992). Bacterial biofilms as a trophic resource for certain benthic foraminifera. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 83, pp 263 – 272.
- Boari, C. A., Alves, M. P., Tebaldi, V. M. R., Savian, T. V., Piccoli, R. H. (2009). Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 29 (4), pp 886 – 895.
- Bower, C. K., McGuire, J., Daeschel, M. A. (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 7, pp 152 – 157.
- Cabije, A. H., Agapay, R. C., Tampus, M. V. (2009). Carbon-nitrogen-phosphorus removal and biofilm growth characteristics in an integrated wastewater treatment system involving a rotating biological contactor. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. Vol. 4, pp 735 – 743.
- Carvalho, G., Almeida, B., Fradinho, J., Oehmen, A., Reis, M. A. M., Crespo, M. T. B. (2011). Microbial Characterization of Mercury-Reducing Mixed Cultures Enriched with Different Carbon Sources. *Microbes and Environments*. Vol. 26 (4), pp 293 – 300.
- Center for Biofilm Engineering – 2014 – in <http://www.biofilm.montana.edu/node/2410>
- Chabaud, S., Martin-Laurent, F., Andres, Y., Lakel, A., Cloirec, P. L. (2008). Evolution of Bacterial Community in Experimental Sand Filters: Physiological and Molecular Fingerprints. *Water Air Soil Pollut.* Vol. 195, pp 233 – 241.
- Characklis, W. G., Marshall, K. C. (1989). *Biofilms*. John Wiley, New York.
- Chaudhuri, S. R., Pattanayak, A. K., Thakur, A. R. (2006). Microbial DNA extraction from samples of varied origin. *Current Science*. Vol. 91 (12), pp 1697 – 1700.

- Chaves, L. C. D. (2004). Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável (Tese de Mestrado). Universidade do Minho.
- Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol. 2.
- Cortez, S., Teixeira, P., Oliveira, R., Mota, M. (2008). Rotating biological contactors: a review on main factors affecting performance. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. Vol. 7, pp 155 – 172.
- Costerton, J. W., Irvin, R. T., Cheng, K.-J. (1981). Role of bacterial surface structures in pathogenesis. Critical Reviews in Microbiology. Vol. 8 (4), pp 303 – 338.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial Biofilms. Annual Reviews Microbiology. Vol. 49, pp 711 – 745.
- Dahllöf, I. (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. Current Opinion in Biotechnology. Vol. 13, pp 213 – 217.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (1999). The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all *Bacteria*: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. Systematic and Applied Microbiology. Vol. 22, pp 434 – 444.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R. (1989). Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science. Vol. 243 (4896), pp 1360 – 1363.
- Dutta, S. (2007). Mathematical Modeling of the Performance of a Rotating Biological Contactor for Process Optimisation in Wastewater Treatment. Phd Thesis. Universität Fridericiana zu Karlsruhe.
- Garland, J. L., Mills, A. L. (1991). Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57 (8), pp 2351 – 2359.
- Ghawi, A. H., Kriš, J. (2009). Use of a Rotating Biological Contactor for appropriate technology wastewater treatment. Slovak Journal of Civil Engineering. pp 1 – 8.
- Ginige, M. P., Carvalho, G., Keller, J., Blackall, L. L. (2006). Eco-physiological characterization of fluorescence *in situ* hybridization probe-targeted denitrifiers in activated sludge using culture-independent methods. Letters in Applied Microbiology. pp 1 – 7.
- Guo, Y., Zhu, N., Zhu, S., Deng, C. (2007). Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. Journal of Applied Microbiology. Vol. 103, pp 1344 – 1354.
- Holben, W. E., Feris, K. P., Kettunen, A., Apajalahti, J. H. A. (2004). GC Fractionation Enhances Microbial Community Diversity Assessment and Detection of Minority Populations of Bacteria by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70 (4), pp 2263 – 2270.
- Holden, P. A., Hunt, J. R., Firestone, M. K. (1997). Toluene Diffusion and Reaction in Unsaturated *Pseudomonas putida* Biofilms. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 56 (6), pp 656 – 670.
- Ibrahim, H. T., Qiang, H., Al-Rekabi, W. S., Qiqi, Y. (2012). Improvements in Biofilm Processes for Wastewater Treatment. Pakistan Journal of Nutrition. Vol. 11 (8), pp 708 – 734.
- Ikuma, K., Decho, A. W., Lau, B. L. T. (2013). The Extracellular Bastions of Bacteria – A Biofilm Way of Life. Nature Education Knowledge. Vol. 4 (2).
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?. FEMS Microbiology Letters. Vol. 236, pp 163 – 173.
- Jeppsson, U. (1996). Modelling Aspects of Wastewater Treatment Processes. Lund Institute of Technology (LTH). Sweden.
- Jeyanayagam, S. (2005). True Confessions of the Biological Nutrient Removal Process. Florida Water Resources Journal. pp 37 – 46.

- Joseph, R. (2009). Genes, Microbes, Metazoan Metamorphosis Cambrian Explosion and the Genetically Engineered Earth. *Journal of Cosmology*. Vol. 1, pp 150 – 200.
- Jubilado, N. M. R. (2010). Desenvolvimento de um micro sensor por ultra-som para medição *on-line* da espessura de um biofilme em ambientes submersos. FCT – UNL.
- Kadu, P. A., Rao, Y. R. M. (2012). A Review of Rotating Biological Contactors System. *International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA)*. Vol. 2 (5), pp 2149 – 2153.
- Katsivela, E., Moore, E. R. B., Maroukli, D., Strömpl, C., Pieper, D., Kalogerakis, N. (2005). Bacterial community dynamics during *in-situ* bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. *Biodegradation*. Vol. 16, pp 169 – 180.
- Kent, A. D., Triplett, E. W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Reviews Microbiology*. Vol. 56, pp 211 – 236.
- Kenzaka, T., Ishidoshiro, A., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. (2005). rRNA Sequence-Based Scanning Electron Microscopic Detection of Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71 (9), 5523 – 5531.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 58, pp 169 – 188.
- Kozdrój, J., van Elsas, J. D. (2001). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 43, pp 197 – 212.
- Lau, S. C. K., Liu, W.-T. (2007). Recent advances in molecular techniques for the detection of phylogenetic markers and functional genes in microbial communities. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 275, pp 183 – 190.
- Lazarova, V., Manem, J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Centre of International Research for Water and Environment*. Vol. 29 (10), pp 2227 – 2245.
- Li, M. Y., Zhang, J., Lu, P., Xu, J. L., Li, S. P. (2009). Evaluation of Biological Characteristics of Bacteria Contributing to Biofilm Formation. *Pedosphere*. Vol. 19 (5), pp 554 – 561.
- Li, X. Z., Hauer, B., Rosche, B. (2007). Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 76, pp 1255 – 1262.
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z. M., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., Robinson, E. R., Pallen, M. J. (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews*. Vol. 10, pp 599 – 606.
- Lopes, A. M., Fonseca, Á. (1996). *Biologia Microbiana*. Universidade Aberta.
- Machado, S. M. O. (2005). Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis. Universidade do Minho.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 15 (4), pp 593 – 600.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K.-H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*. Vol. 142, pp 1097 – 1106.
- Martín-Cereceda, M., Álvarez, A. M., Serrano, S., Guinea, A. (2001) (a). Confocal and Light Microscope Examination of Protozoa and Other Microorganisms in the Biofilms from a Rotating Biological Contactor Wastewater Treatment Plant. *Acta Protozoologica*. Vol. 40, pp 263 – 272.
- Martín-Cereceda, M., Pérez-Uz, B., Serrano, S., Guinea, A. (2001) (b). Dynamics of protozoan and metazoan communities in a full scale wastewater treatment plant by rotating biological contactors. *Microbiological Research*. Vol. 156, pp 225 – 238.

- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*.
- Maurício, R. (2009). Contribuição para o estudo de biofilmes de espessura controlada – Idade do biofilme (Tese de Doutorado). FCT – UNL.
- Maurício, R., Amaral, L. (2012). Discos Biológicos. Apoio às aulas de Drenagem e Tratamento de Águas Residuais. FCT – UNL.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1999). Specific Oligonucleotide Probes for in situ Detection of a Major Group of Gram-positive Bacteria with low DNA G+C content. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 22, pp 186 – 196.
- Meireles, M. F. R. (2011). Optimização da Estação de Tratamento de Águas Residuais de Crestuma. Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- Metcalf & Eddy. (2003). *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. 4th Edition. McGraw-Hill Companies, Inc. New York.
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G. J. (1999). Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65 (8), pp 3518 – 3525.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 73, pp 127 – 141.
- Neto, L. G. L., Costa, R. H. R. (2011). Tratamento de esgoto sanitário em reator híbrido em bateladas sequenciais: eficiência e estabilidade na remoção de matéria orgânica e nutrientes (N, P). *Eng Sanit Ambient*. Vol. 16 (4), pp 411 – 420.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A. K. (2007). Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microbial Ecology*. Vol. 54, pp 276 – 289.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L. L., Keller, J. (2005). Comparison of Acetate and Propionate Uptake by Polyphosphate Accumulating Organisms and Glycogen Accumulating Organisms. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 91 (2), pp 162 – 168.
- Okabe, S., Kindaichi, T., Ito, T. (2004). MAR-FISH – An Ecophysiological Approach to Link Phylogenetic Affiliation and *In Situ* Metabolic Activity of Microorganisms at a Single-Cell Resolution. *Microbes and Environments*. Vol. 19 (2), pp 83 – 98.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews Microbiology*. Vol. 54, pp 49 – 79.
- Paul, B. J., Duthie, H. C., Taylor, W. D. (1991). Nutrient cycling by biofilms in running waters of differing nutrient status. *Journal of the North American Benthological Society*. Vol. 10 (1), pp 31 – 41.
- Pereira, M. O. (2001). Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme (Tese de Doutorado). Universidade do Minho.
- Peulen, T. O., Wilkinson, K. J. (2011). Diffusion of Nanoparticles in a Biofilm. *Environmental Science & Technology*. Vol. 45, pp 3367 – 3373.
- Pompermayer, D. M. C., Gaylarde, C. C. (2000). The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*. Vol. 17, pp 361 – 365.
- Pontes, D. S., Lima-Bittencourt, C. I., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. M. A. (2007). Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *J Ind Microbiol Biotechnol*. Vol. 34, pp 463 – 473.
- Prosser, J. I. (2002). Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*. Vol. 244, pp 9 – 17.

- Radwan, K. H., Ramanujam, T. K. (1997). Studies on organic removal of 2,4-dichlorophenol wastewaters using a modified RBC. *Bioprocess Engineering*. Vol. 16, pp 219 – 223.
- Ricardo, A. R., Carvalho, G., Velizarov, S., Crespo, J. G., Reis, M. A. M. (2012). Kinetics of nitrate and perchlorate removal and biofilm stratification in an ion exchange membrane bioreactor. *Water Research*. Vol. 46, pp 4556 – 4568.
- Rodgers, M., Zhan, X.-M. (2003). Moving-medium biofilm reactors. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Vol. 2, pp 213 – 224.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R. Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1994). *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*. Vol. 140, pp 2849 – 2858.
- Rosário, A. C. (2009). Caracterização de populações microbianas em reactores “Jet-Loop” para tratamento de efluentes agro-industriais (Tese de Doutoramento). Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Searcy, K. E., Packman, A. I., Atwill, E. R., Harter, T. (2006). Capture and Retention of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72 (9), pp 6242 – 6247.
- Shiraishi, F., Zippel, B., Neu, T. R., Arp, G. (2008). *In situ* detection of bacteria in calcified biofilms using FISH and CARD-FISH. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 75, pp 103 – 108.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*. Vol. 21, pp 1794 – 1805.
- Silva, A. F., Carvalho, G., Oehmen, A., Lousada-Ferreira, M., Nieuwenhuijzen, A. van, Reis, M. A. M., Crespo, M. T. B. (2012). Microbial population analysis of nutrient removal-related organisms in membrane bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 93, pp 2171 – 2180.
- Sims, G. K. (2007). Stable isotope probing to investigate microbial function in soil. *Research Signpost*. pp 1 – 23.
- Singh, R., Paul, D., Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*. Vol. 14 (9), pp 389 – 397.
- Spormann, A. M. (2008). *Physiology of Microbes in Biofilms*. Stanford University. pp 17 – 36.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005). American Public Health Association (APHA). 21st Edition.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. R. (1995). *General Microbiology*. 5th Edition. MacMillan Press.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M. F., Massé, D. I. (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research*. Vol. 42, pp 513 – 537.
- Teixeira, P., Oliveira, R. (2001). Denitrification in a closed rotating biological contactor: effect of disk submergence. *Process Biochemistry*. Vol. 37, pp 345 – 349.
- Unz, R. F., Shuttleworth, K. L. (1996). Microbial mobilization and immobilization of heavy metals. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 7, pp 307 – 310.
- Viana, E. S. (2006). Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrófilas isoladas de leite (Tese de Doutoramento). Universidade Federal de Viçosa.
- Wagner, M., Horn, M., Daims, H. (2003). Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 6, pp 302 – 309.
- Wagner, M., Smidt, H., Loy, A., Zhou, J. (2007). Unravelling Microbial Communities with DNA-Microarrays: Challenges and Future Directions. *Microbial Ecology*. Vol. 53, pp 498 – 506.

Wallner, G., Amann, R., Beisker, W. (1993). Optimizing Fluorescent In Situ Hybridization With rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms. *Cytometry*. Vol. 14, pp 136 – 143.

White, C., Sharman, A. K., Gadd, G. M. (1998). An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nature Biotechnology*. Vol. 16 (6), pp 572 – 575.

Wijeyekoon, S., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T. (2004). Effects of substrate loading rate on biofilm structure. *Water Research*. Vol. 38, pp 2479 – 2488.

WS Atkins Environment. (2000). Review of the methodologies for the extraction, detection and identification of microorganisms in the environment. Woodcote Grove, Ashley Road, Epsom, Surrey.

Xavier, J. B., Picioreanu, C., Almeida, J. S., van Loosdrecht, M. C. M. (n. d.). Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*.

Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G., Lewandowski, Z. (2001). Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Water Research*. Vol. 35 (5), pp 1149 – 1158.

Zhang, T., Fang, H. H. P. (2000). Digitization of DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities. *Biotechnology Letters*. Vol. 22, pp 399 – 405.

Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I., Gaskins, H. R. (2004). Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *The Journal of Nutrition*. Vol. 134, pp 465 – 472.

Sites consultados

<http://www.npswastewater.com/rotating%20biological%20contactors.htm> (acedido a 05/09/2014)

<http://www.gpsd.dst.il.us/tourmain.htm> (acedido a 05/09/2014)

<http://eol.org/pages/90697/overview> (acedido a 08/09/2014)

<http://wastewaterbacteria.blogspot.pt/2011/07/common-bacteria-fungi-and-protozoa.html> (acedido a 08/09/2014)